



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EM BIOLOGIA
CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO**

**AVALIAÇÃO DO NICHOS MOLECULAR DE CÉLULAS-
TRONCO HEMATOPOÉTICAS E MESENQUIMAIS EM
PLACENTA HUMANA: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL
E ULTRAESTRUTURAL**

ROGÉRIO GARGIONI

**FLORIANÓPOLIS - SC
2014**

ROGÉRIO GARGIONI

**AVALIAÇÃO DO NICHÔ MOLECULAR DE CÉLULAS-
TRONCO HEMATOPOÉTICAS E MESENQUIMAIS EM
PLACENTA HUMANA: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL
E ULTRAESTRUTURAL**

Tese de Doutorado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e do
Desenvolvimento, Centro de
Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina.

Prof. Dr. Márcio Alvarez da Silva

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gargioni, Rogério

Avaliação do Nicho molecular de Células-tronco Hematopoéticas e Mesenquimais em Placenta Humana: Caracterização Estrutural e Ultraestrutural / Rogério Gargioni; orientador, Márcio Alvarez da Silva – Florianópolis, SC; 2014.

118 p.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular. 2. placenta a termo. 3. nicho. 4. células-tronco e matriz extracelular. I. Silva, Márcio Alvarez. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Avaliação do Nicho Molecular de Células Tronco Hematopoéticas e Mesenquimais em Placenta Humana: Caracterização Estrutural e Ultraestrutural

por

Rogério Gargioni

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 17/PPGBCD/2014) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Prof. Dr. Márcio Alvarez da Silva (BEG/CCB/UFSC)
orientador

Prof^a. Dr^a. Yara Maria Rauh Muller
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Claudia Pinto Figueiredo (UFRJ)

Prof. Dr. Eduardo Cargnin Ferreira (IFSC)

Prof^a. Dr^a. Eliane Maria Goldfeder (MOR/CCB/UFSC)

Prof^a. Dr^a. Mabel Mariela Rodriguez Cordeiro (MOR/CCB/UFSC)

Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez (BEG/CCB/UFSC)

Florianópolis, 25 de Setembro de 2014

Agradecimentos

A Deus por ter me proporcionado a possibilidade de ter um contato mais estreito com a ciência.

Ao meu orientador Professor Dr. Marcio Alvarez da Silva, pela atenção, confiança e dedicação no desenvolvimento e na conclusão dos trabalhos.

Ao Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (CCB/UFSC), por toda a assistência indispensável à realização deste projeto.

Ao assistente administrativo Anselmo Soethe Nurnberg do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (CCB/UFSC), pelo apoio prestado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento (PPGBCD/CCB/UFSC), que no decorrer de todo o curso se empenharam, compartilhando o conhecimento e contribuindo para o meu crescimento intelectual.

Também, aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento (PPGBCD/CCB/UFSC), que participaram desta minha conquista.

Aos Professores Dra. Andréa Gonçalves Trentin, Dra. Zenilda Laurita Bouzon, Dra. Cristine Maria Bressan, Dr. Anicleto Poli, Dra. Kieiv Resende Souza de Moura pelo apoio prestado durante o desenvolvimento dos trabalhos neste projeto.

Aos técnicos do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC), Eliana de Medeiros Oliveira, Renata Ávila Ozório, Eduardo de Almeida Isoppo e Luciano de Oliveira, pela grande colaboração prestada, desde a microtomia do material biológico até a captura das imagens no microscópio eletrônico de transmissão.

Aos técnicos do Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia II (LAMED II), Chirle Ferreira, Demétrio Gomes Alves e Emely Daiana dos Santos, pelo apoio dado na captura das imagens de microscopia de fluorescência.

À Senhora Sônia Palácios do Centro de Obstetrícia do Hospital Universitário (HU-UFSC), pela cordialidade e colaboração em disponibilizar as placentas (material biológico) que foi de extrema importância para a viabilização do projeto.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, Maristela Maria Martini, Éder Carlos Schmidt, Talita da Silva Geremias, Rodrigo Willamil dos Santos, Juçara Loli de Oliveira, Fernanda Rosane Melo, Diana Heck, Aloísio Luiz Benedetti, Sandra Regina Rachadel Torres, Fabiana de Fátima Ferreira, Ticiane Rover, Carmen Simioni e Günther Gerhard Gerent que, de uma forma ou de outra, compartilharam seus conhecimentos no desenvolvimento das atividades ao longo do curso.

Aos técnicos administrativos do Departamento de Biologia Celular e Embriologia e Genética, Jalmor Pereira dos Anjos e Ismael Quit, pela colaboração prestada durante a realização do curso.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, participaram desta minha conquista.

Ao CNPq e à FAPESC pelo apoio financeiro, sem o qual não teria sido possível o desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimentos Especiais...

À minha mãe Arcila e aos meus irmãos, Tarcísio, Sérgio, Mari, Rosalene, Lucilene e Ivonete pelo apoio, pelo amor e por me ensinarem que o valor da vida reside nas pessoas que temos ao nosso lado, com seus ensinamentos e como exemplo de vida.

RESUMO

A placenta é um órgão essencial no desenvolvimento embrionário e fetal. Este órgão contém vários tipos de células, entre as quais diferentes populações de células-tronco ou progenitoras, tais como as células-tronco mesenquimais (CTM), células-tronco hematopoéticas (CTHs) e trofoblásticas. O objetivo deste trabalho foi estudar a organização do nicho molecular de células-tronco no tecido da placenta humana a termo. Para isto, foram utilizadas técnicas histológicas, histoquímicas, imuno-histoquímicas e de microscopia eletrônica de transmissão (MET). As técnicas de coloração histológica empregadas nas amostras do tecido tiveram como objetivo identificar, principalmente, as características estruturais das vilosidades coriônicas (VC) e da decídua basal (DB). A técnica de coloração de Hematoxilina e eosina proporcionou uma visão geral do tecido placentário, de modo a permitir a identificação dos elementos teciduais da placenta. A técnica de coloração azul brilhante de Coomassie foi utilizada para identificar a presença de proteínas totais neste tecido. Outro teste utilizado foi Azul de toluidina (ATO) para identificar a presença de polissacarídeos ácidos, através da reação de metacromasia. As amostras, contendo o tecido placentário, reagiram mais fortemente com o ATO nas regiões do sinciciotrofoblasto, nos núcleos das células que compõem o estroma e na parede dos vasos sanguíneos das vilosidades coriônicas. Na região da decídua basal, a reação também foi positiva ao ATO nas células deciduais, porém, na matriz extracelular esta reação foi menos intensa, quando comparada com as regiões do sinciciotrofoblasto e da parede dos vasos sanguíneos das vilosidades coriônicas. Testes realizados com o ácido periódico de Schiff mostraram que a reação foi positiva em praticamente todas as regiões das vilosidades, mas houve uma positividade maior na região do sinciciotrofoblasto. Com relação à decídua basal (DB), a presença de polissacarídeos neutros também foi confirmada em praticamente todas as regiões da decídua. A técnica de Mallory revelou que fibras de colágeno estão presentes em grande parte nas regiões tanto das vilosidades coriônicas, bem como, na decídua basal. Esta técnica é capaz de revelar a presença dos diferentes tipos colágenos que estão presentes tanto nas vilosidades coriônicas quanto na decídua basal, porém, sem a identificação de quais são os tipos presentes neste tecido. A técnica de imuno-histoquímica empregada no tecido da placenta teve como objetivo avaliar a expressão dos marcadores CD73, CD105 e CD34, bem como, o perfil de expressão do colágeno do tipo I, fibronectina e laminina na matriz extracelular (MEC). O perfil expresso

pelos marcadores CD73⁺, CD105⁺ e CD34⁺ na superfície da membrana das células, e pelas moléculas de MEC como o colágeno do tipo I, a fibronectina e a laminina, se mostrou positivo. Estes resultados nos mostram que as CTMs tem uma disposição na região das vilosidades coriônicas, em associação com moléculas de laminina e de colágeno. A fibronectina se expressa nas vilosidades coriônicas sempre com associação à lâmina basal e perivascularmente. No sinciciotrofoblasto as CTM se associam próximas às células CD34⁺ com característica de CTH. As análises ultraestruturais demonstraram plena atividade metabólica e de células que organizam a placenta, tanto bioquimicamente quanto metabolicamente, sugerindo que a placenta, mesmo a termo, é ainda capaz de produções celulares, tanto de CTs quanto na homeostase do tecido.

Palavras-chave: placenta a termo, nicho, células-tronco e matriz extracelular.

ABSTRACT

Placenta is an essential organ in the development of the embryo and/or fetus. It is a readily available material, easy to obtain, and there is no association between its use and risks for the mother or fetus health. The organ contains several types of cells, including different populations of stem cells or progenitor cells, such as mesenchymal stem cells (CTM), hematopoietic stem cells (CTHs) and trophoblast. The aim of this work was to study the molecular niche organization of stem cells in the tissue of human placenta at term. Therefore, it was possible to use histological, histochemical and immunohistochemical techniques, and also, transmission electron microscopy (TEM). Histological staining techniques employed on tissue samples aimed to identify, mainly, the structural characteristics of chorionic villi (VC) and decidua basalis (DB). Hematoxylin and eosin stain provided placental tissue overview in order to enable the identification of placenta tissue elements. Coomassie brilliant blue staining technique was used to determine the presence of total protein in the tissue. Results showed the placental tissue structures as a whole. Another test performed was toluidine blue (ATO) to identify the presence of acidic polysaccharides by metachromasia reaction. Samples with placental tissue reacted more strongly to the ATO in regions of syncytiotrophoblast, cells nuclei comprising the stroma and blood vessels wall of the chorionic villi. In the basal decidua region, there was also a positive reaction to ATO. However, it was less intense when compared to the regions of syncytiotrophoblast of chorionic villi of tissue. Tests performed with periodic acid of Schiff showed that the reaction was positive in virtually all regions of the villi, but there was a greater positivity in the syncytiotrophoblast region. With respect to basal decidua (DB), the presence of neutral polysaccharides was also confirmed in practically all regions of decidua. Mallory technique revealed that collagen fibers are present largely in the areas of both chorionic villi and basal decidua. That technique can reveal the presence of different collagen types that are present in both chorionic villi and basal decidua; however, without identifying which types are present in the tissue. The immunohistochemical technique employed in placental tissue aimed to evaluate the markers expression: CD73, CD105 and CD34, as well as the expression profile of collagen type I, fibronectin and laminin in the extracellular matrix (MEC). Profile expressed by markers CD73⁺, CD105⁺ and CD34⁺ on cells membrane surface and MEC molecules such as collagen type I, fibronectin and laminin showed in a positive

way. These results show that CTMs have a disposition in the region of chorionic villi in association with molecules of laminin and collagen. Fibronectin is expressed in chorionic villi always associated with basal lamina and perivascularly. In the Syncytiotrophoblast, CTM associate close to CD34⁺ cells with CTH characteristics. Ultrastructural analysis presented full metabolic activity and cells that organize the placenta both biochemically and metabolically, suggesting that the placenta even at term is still capable of cells production not only of CTs, but also for tissue homeostasis.

Key words: placenta at term, niche, stem cells and extracellular matrix.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho esquemático de uma secção transversal de uma placenta.....	25
Figura 2	Face materna da placenta humana a termo.....	47
Figura 3	Corte transversal da placenta humana a termo.....	48
Figura 4	Vilosidades coriônicas da placenta humana a termo, coradas com Hematoxilina Eosina.....	56
Figura 5	Vilosidades coriônicas e da decídua basal da placenta humana a termo, coradas com Hematoxilina e Eosina.....	57
Figura 6	Vilosidades coriônicas e da decídua basal da placenta humana a termo, coradas com Azul Brilhante de Coomassie.....	58
Figura 7	Vilosidades coriônicas e da decídua basal da placenta humana a termo, coradas com Azul de Toluidina.....	60
Figura 8	Vilosidades coriônicas e da decídua basal da placenta humana a, coradas com Ácido Periódico de Schiff.....	61
Figura 9	Vilosidades coriônicas e da decídua basal da placenta humana a termo, coradas com Ácido Periódico de Schiff e contra-corada com Hematoxilina.....	62
Figura 10	Vilosidades coriônicas e da decídua basal da placenta humana a termo, coradas pela Técnica de Mallory e contra-coradas com Hematoxilina.....	64
Figura 11	Expressão do colágeno tipo I nas vilosidades coriônicas e na decídua basal do tecido da placenta humana a termo contra coradas com Hematoxilina.	66
Figure 12	Expressão de fibronectina nas vilosidades coriônicas da placenta humana a termo e contra-coradas com Hematoxilina.....	67
Figure 13	Expressão de laminina nas vilosidades coriônicas da placenta humana a termo e contra-coradas com Hematoxilina.....	69

Figura 14	Expressão do marcador de superfície CD 73 nas vilosidades coriônicas e na decídua basal do tecido da placenta humana a termo e contra-coradas com Hematoxilina.....	70
Figura 15	Expressão do marcador de superfície CD 105 nas vilosidades coriônicas da placenta humana a termo e contra-coradas com Hematoxilina.....	72
Figura 16	Expressão do marcador de superfície CD 34 nas vilosidades coriônicas e na decídua basal da placenta humana a termo e contra-coradas com DAPI.....	73
Figura 17	Vilosidades coriônicas da placenta humana a termo, analisadas em microscópio eletrônico de transmissão.....	76
Figura 18	Vilosidades coriônicas da placenta humana a termo, analisadas em microscópio eletrônico de transmissão.....	78
Figura 19	Representação esquemática de uma vilosidade coriônica do tecido da placenta humana.....	87
Figura 20	Representação esquemática dos diferentes tipos celulares e moleculares, relacionados com uma célula-tronco (CT) da vilosidade coriônica da placenta humana.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Painel de anticorpos primários e secundários utilizados na caracterização das células e moléculas do tecido de placenta humana a termo.....	52
-----------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius
μM – micromolar
AC – anticorpos
ATO – azul de toluidina
C – citoplasma
Ca – capilar
CBB – do inglês “Coomassie brilliant blue”
CC – células citotrofoblásticas
CTB – citotrofoblasto
CDe – célula decidual
CD – do inglês “Cluster of differentiation”
CE – citotrofoblasto extraviloso
CG – complexo de Golgi
CH – célula de Hofbauer
CM – canais de macropinocitose
CMV – corpos multivesiculares
Col – colágeno
CT – células-tronco
CTHs – células-tronco hematopoéticas
CTMs – células-tronco mesenquimais
D – desmossomo
DAB – 3, 3’ Diaminobenzidina tetrahidrocloreto dihidrato
DAPI – Dihidrocloreto de 4’, 6 – diamidino-2-finilindole
DB – decídua basal
DG – depósito de glicogênio
E – endotélio
EF – endotélio fetal
EI – espaço interviloso
Ep – epitélio
ET – estroma
F – fibroblasto
FC – fibras de colágeno
FCT – filamentos citoplasmáticos
FITIC – isiotiocianato de fluoresceína
FN – fibronectina
GA – glutaraldeído
GAGs - glicosaminoglicanos
h – hora
He – eritrócito

ID – interdigitações
IHQ – imuno-histoquímica
J – junção intercelular
KH₂PO₄ – Fosfato de potássio monobásico anidro
L – lipídios
Le – leucócito
Li – lisossomo
LN – laminina
LP – lâmina própria
LPCT – Laboratório de Tecnologia e Processamento de Células e Tecidos
MA – microvilos apical
MB – membrana basal
MF - microscopia de fluorescência
mg – miligrama
min – minutos
Mit – mitocôndria
Miv – microvilos
ML - microscopia de luz
Mt – microtúbulo
N – núcleo
NC – núcleo de célula citotrofoblática
NCS – núcleo de célula do sinciotrofoblasto
NS – nó sincicial
Nu – nucléolo
PAS – ácido periódico de Schiff
PBS – salina tamponada com fosfato (solução tampão fosfato)
PBT – Solução tampão salina com Tween 20
PC – placa coriônica
PFA – paraformaldeído
PGs – proteoglicanos
pH – potencial hidrogeniônico
PVS – parede do vaso sanguíneo
R – ribossomo
RER – retículo endoplasmático rugoso
SBF – soro fetal bovino
STB – sinciotrofoblasto
TA – temperatura ambiente
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
V – vesícula
Va – vesícula apical

VE – vesícula endocítica
Vil – vilosidade
VS – vaso sanguíneo
VSC – vesícula de secreção
VT – vilosidades terminais
ZJ – zona juncional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Placenta.....	23
1.1.1 Placenta a termo.....	25
1.1.2 Placenta humana como fonte de células-tronco.....	26
1.2 Célula-tronco.....	28
1.2.1 Definição.....	28
1.2.2 Classificação das células-tronco.....	29
1.2.2.1 Células-tronco embrionárias.....	29
1.2.2.2 Células-tronco adultas.....	30
1.2.2.3 Terapia celular com células-tronco adultas.....	32
1.3 Matriz extracelular.....	35
1.3.1 Colágenos.....	35
1.3.2 Fibronectina.....	37
1.3.3 Laminina.....	39
1.4 Nicho celular.....	39
2. OBJETIVOS.....	43
2.1 Objetivo Geral.....	43
2.2 Objetivos Específicos.....	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1 Obtenção da placenta humana.....	45
3.2 Coleta e processamento do material biológico.....	45
3.3 Análise em microscopia de luz.....	48
3.3.1 Colorações histológicas usuais.....	48
3.3.1.1 Coloração com Hematoxilina de Harris e Eosina Amarelada.....	48
3.3.1.2 Azul de toluidina.....	49
3.3.2 Colorações histológicas especiais.....	49
3.3.2.1 Azul brilhante de Coomassie.....	49
3.3.2.2 Ácido Periódico de Schiff.....	50
3.3.2.3 Coloração Tricômico de Mallory.....	50
3.3.3 Imuno-histoquímica.....	51
3.4 Análise em microscopia eletrônica de transmissão.....	52
4. RESULTADOS.....	55
4.1 Colorações histológicas.....	55
4.1.1 Coloração com Hematoxilina de Harris e Eosina Amarelada...	55
4.1.2 Azul brilhante de Coomassie.....	58

4.1.3 Azul de toluidina.....	59
4.1.4 A Técnica do Ácido Periódico de Schiff.....	60
4.1.5 Coloração Tricrômico de Mallory.....	63
4.2 A Técnica de Imuno-histoquímica.....	65
4.2.1 Expressão do Colágeno tipo I.....	65
4.2.2 Expressão de Fibronectina.....	67
4.2.3 Expressão de Laminina.....	68
4.2.4 Expressão do marcador CD73.....	70
4.2.5 Expressão do marcador CD105.....	72
4.2.6 Expressão do marcador CD34.....	73
4.3 Análise em microscopia eletrônica de transmissão.....	74
5. DISCUSSÃO.....	81
6. CONCLUSÕES.....	93
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

1. INTRODUÇÃO

1.1 PLACENTA

A placenta é um órgão de tecidos materno-fetal, altamente vascularizado, que desempenha importantes funções para a manutenção da gravidez e promoção do desenvolvimento do feto, como: a) transferência de produtos entre a mãe e o feto em ambas as direções, tais como gases, nutrientes e eletrólitos, anticorpos maternos, produtos de excreção; b) metabolismo, pois sintetiza glicogênio, colesterol e ácidos graxos que servem como fonte de nutrientes e energia para o embrião/feto particularmente na fase inicial da gravidez; c) síntese e secreção de hormônios protéicos (tais como a Gonadotrofina Coriônica humana, a somatotrofina coriônica humana ou lactogênio placentário humano, a tireotrofina coriônica humana) e esteróides (MOORE & PERSAUD, 2008; GARCIA & FERNÁNDEZ, 2012).

Este órgão começa a se desenvolver dentro de poucos dias após a fertilização e é fundamental para o desenvolvimento e sobrevivência do feto durante a gestação. A placenta também atua como o pulmão, rim e sistema digestivo para o feto em desenvolvimento e protege o feto da infecção durante o desenvolvimento (PAROLINI *et al.*, 2008).

A placenta é considerada um órgão materno-fetal por possuir dois componentes: uma porção fetal e uma porção materna. A parte fetal é derivada do córion viloso, enquanto que a parte materna é originada de uma porção do endométrio uterino chamada de decídua basal (MOORE & PERSAUD, 2008).

O córion é um conjunto de tecidos derivado do citotrofoblasto, sinciciotrofoblasto e mesoderma extra-embriônico, sendo estruturas extra-embriônicas que se organizam durante a implantação do blastocisto no endométrio uterino, formando a parede do saco coriônico. A partir do final da 2ª semana ocorre a formação de vilosidades em toda a extensão do córion. O saco coriônico permanece recoberto por vilosidades coriônicas até o início da 8ª semana. Com o desenvolvimento do embrião e do saco coriônico, permanecem somente as vilosidades coriônicas associadas à porção do endométrio uterino (a decídua basal) que irá participar da placenta, formando o córion viloso (porção fetal da placenta). Neste local, durante o resto da gestação, as vilosidades da placa coriônica aumentam em número, se ramificam, crescem e tonam-se vascularizadas (MOORE & PERSAUD, 2008; SCHOENWOLF *et al.*, 2009).

A decídua refere-se à camada funcional do endométrio gravídico que se separa do restante do útero após o parto. A porção da decídua que fica associada ao córion viloso é chamada de decídua basal (porção materna da placenta). Esta decídua consiste de uma camada compacta de células grandes, chamadas de células decíduais, de diferentes origens, em conjunto com a matriz extracelular abundante abundante. Estas células contêm grandes quantidades de lipídios e glicogênio acumulados no citoplasma (MOORE & PERSAUD, 2008; SCHOENWOLF *et al.*, 2009). As mudanças celulares e vasculares que acontecem no endométrio durante a implantação do blastocisto é chamada de reação decidual (MOORE & PERSAUD, 2008).

Durante a formação da placenta, as vilosidades que se desenvolvem a partir da placa coriônica invadem a decídua basal fazendo com que o tecido da decídua sofra erosão, aumentando os espaços entre as vilosidades (espaços intervilosos). Esse processo de erosão produz várias áreas cuneiformes na decídua basal, denominados de septos deciduais (ou placentários) que se projetam nos espaços intervilosos, mas não alcançam a placa coriônica, fazendo com que o contato entre os espaços intervilosos nos diversos cotilédones seja mantido. Os septos deciduais dividem a parte fetal da placenta em áreas convexas irregulares denominadas de cotilédones. Cada cotilédone é formado por duas ou mais vilosidades tronco e seus inúmeros ramos (Figura 1) (MOORE & PERSAUD, 2008; SCHOENWOLF *et al.*, 2009).

Como resultado do crescimento contínuo do feto e da expansão do útero, a placenta também aumenta de tamanho. A placenta totalmente desenvolvida cobre de 15% a 30% da superfície interna do útero (MOORE & PERSAUD, 2008). No início do segundo trimestre, a relação entre o peso da placenta e a do feto é 1:1 e, ao final da gestação, esta relação é de aproximadamente 1:6 (ADAIR & THELANDER, 1925; WALKER, 1954).

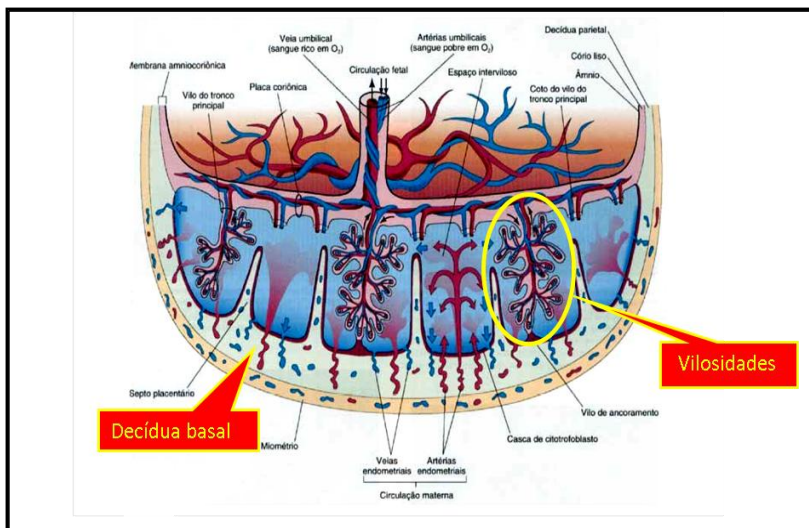


Figura 1. Desenho esquemático de uma seção transversal de uma placenta, com destaque para as regiões de estudos, como as vilosidades e a decídua basal (*Ilustração modificada*). Adaptado de Callen PW. *Ultrasonography in Obstetrics and Gynecology*. 4th ed.

1.1.1 Placenta a Termo

A placenta a termo apresenta uma forma variável, predominando, entretanto, a forma discoidal e a ovalar. Tem um diâmetro que oscila entre 15 a 20 cm e a sua espessura é, aproximadamente, de 1,5 a 3,0 cm. Seu peso varia, em média, de 400 a 600g ao nascimento. A face materna da placenta é constituída de 15 a 20 cotilédones de tamanho variável. Os cotilédones apresentam uma consistência mole, esponjosa e estão separados entre si por sulcos irregulares – os sulcos intercotiledonários – que correspondem aos septos deciduais (SARWEY, 1938; BENIRSCHKE, 1961).

A placenta apresenta as faces materna e fetal bem distintas. O aspecto característico da face materna da placenta é causado pelos cotilédones, os quais são separados por sulcos. A superfície dos cotilédones é recoberta por delgados fragmentos acinzentados da decídua basal que se separam da parede uterina quando a placenta é expulsa. Esses fragmentos de tecido são reconhecíveis em cortes de placenta examinados ao microscópio. A maior parte da decídua é

temporariamente retida no útero e eliminada com o sangramento uterino (MOORE & PERSAUD, 2008).

O exame pré-natal da placenta, por ultrassom ou por ressonância magnética, ou após o nascimento, pelo estudo macro e microscópico, pode dar informações clínicas sobre as causas de disfunção placentária, sofrimento e morte fetal e doença neonatal. Estudos da placenta também podem determinar se ela está completa. A retenção de um cotilédono ou de uma placenta acessória no útero pode causar hemorragia uterina grave (MOORE & PERSAUD, 2008).

A face fetal da placenta é lisa, brilhante e de cor cinza-azulada clara. A superfície fetal é inteiramente coberta pelo âmnio, através do qual se observam as ramificações dos vasos umbilicais (WOODLING *et al.*, 1976). O âmnio está intimamente unido ao córion e funde-se a ele junto à borda da placenta. Nas placentas a termo nota-se nas bordas, sob as membranas, um anel fibroso e, sob o córion, encontram-se depósitos esparsos de fibrina sob a forma de nódulos ou placas brancas de dimensões variáveis (HAMILTON *et al.*, 1964).

A placenta humana a termo representa uma fonte atraente de célula-tronco, devido à sua pronta disponibilidade, o seu fácil acesso, sem procedimentos invasivos, e não envolve também, as questões religiosas e éticas.

1.1.2 Placenta humana como fonte de células-tronco

A placenta humana, além de ser fundamental no desenvolvimento e nas trocas de hormônios e nutrientes com o feto, também é uma fonte importante de células-tronco/progenitoras (PAROLINI *et al.*, 2008).

A placenta é o primeiro órgão formado no desenvolvimento humano e contém vários tipos de células originárias de diferentes regiões do blastocisto. Este órgão possui diferentes populações de células-tronco e progenitores, tais como as mesenquimais, as hematopoéticas e as células trofoblástica (MIKI *et al.* 2007).

A placenta desperta grande interesse dos biólogos celulares, uma vez que este órgão é rico em células-tronco e seus progenitores. Uma célula-tronco é definida como uma célula que tem a capacidade de auto-renovação e que pode diferenciar e originar (células filhas) de uma ou mais camadas germinativas. As células-tronco são classificadas como totipotentes, pluripotentes ou multipotentes. A célula-tronco mais primitiva, com a maior capacidade de se diferenciar, é a célula totipotente (MITALIPOV & WOLF, 2009). Esta célula ocorre a partir

da primeira divisão do zigoto e tem a capacidade para formar um organismo inteiro. Uma vez que estas células totipotentes começam a se dividir, originando o embrião e a placenta. O embrião quando atinge a fase de 32 células, conhecido como mórula, as células que perderam a sua totipotência se transformam em células pluripotentes (MITALPOV & WOLF, 2009, WITKOWSKA-ZIMNY & WROBEL, 2011). Estas células pluripotentes contribuem para a formação das três camadas germinais no embrião em desenvolvimento, a endoderme, a mesoderme e a ectoderme. As células-tronco com capacidade limitada de diferenciação são conhecidas como células-tronco multipotentes e podem diferenciar-se em vários tipos de células dentro da mesma camada germinativa. Células-tronco multipotentes estão comprometidas com um órgão ou um tecido especial e são células-tronco mais maduras (WITKOWSKA-ZIMNY & WROBEL, 2011).

Estudos mostram que as células-tronco mesenquimais (MSCs) derivadas da placenta podem ser facilmente isoladas e expandidas sem alterações morfológicas, no meio suplementado apenas com FBS. Com isso, a placenta pode ser uma fonte atraente de MSCs (GROZA *et al.*, 2010).

Atualmente há um grande interesse na utilização da placenta humana como fonte alternativa de CTs. Uma opção para sua utilização é na medicina regenerativa, principalmente em razão da plasticidade fenotípica demonstrada pelas CTMs isoladas da placenta. Outra vantagem para a sua utilização é com relação à disponibilidade, à facilidade de obtenção da mesma após o parto e a quantidade de material disponibilizado. Além disso, na utilização da placenta não há implicações de ordem ética e religiosa. Portanto, no futuro, ela também poderá ser utilizada para terapia celular, seja para utilização autogênica ou alogênica (PAROLINI *et al.*, 2008).

Células originárias da placenta têm um potencial de diferenciação similar às CTMs. Este órgão é uma grande fonte de CTMs. Os resultados iniciais mostram que estas células não só podem ser importantes para uso terapêutico, bem como, uma fonte alternativa de CTs para a pesquisa básica. Mais estudos são necessários para melhor entender a natureza das células da placenta e também explorar uma potencial aplicação clínica (ZONGNING *et al.*, 2006).

Trabalhos realizados (ALVAREZ-SILVA *et al.*, 2003; ANKER *et al.*, 2004; GEKAS *et al.*, 2005; MIKKOLA *et al.*, 2005; CHIEN *et al.*, 2006; YEN *et al.*, 2008;) descrevem que as CTs são produzidas na placenta durante o desenvolvimento, permanecendo mesmo após o nascimento. Entretanto, poucos trabalhos descreveram a organização

molecular do nicho organizador de CTs neste tecido. Estudos sugerem que a capacidade de atuar como nicho, pelo menos para CTHs, deriva da produção local de fatores hematopoéticos (GEKAS *et al.*, 2005; LI, 2005; MIKKOLA *et al.*, 2005). A manutenção do nicho de CTs na placenta com relação à organização das fibras de colágeno e outras moléculas também é pouco estudado.

O presente trabalho tem como objetivo a longo prazo, compreender melhor a organização molecular do nicho organizador de CTs neste tecido, bem como, aprofundar ainda mais os conhecimentos já existentes e mostrar que a placenta humana é uma importante fonte de células-tronco.

Portanto, mais estudos são necessários para melhor compreender a natureza exata das células derivadas da placenta e também, poder explorar as suas potenciais aplicações clínicas (GROZA *et al.*, 2010).

1.2 CÉLULAS-TRONCO

1.2.1 Definição

A definição de célula-tronco (CT) segundo VERFAILLIE (2002) é baseada em três principais características: 1) a capacidade de auto-renovação ilimitada, possibilitando a geração de no mínimo uma célula-filha com características similares às da célula-mãe; 2) o potencial para diferenciação em outras linhagens celulares, tais como cardiomiócitos, hepatócitos, ilhotas pancreáticas e células nervosas e 3) a capacidade de reconstruir funcionalmente, *in vivo*, um tecido lesado.

Estas características já foram descritas, por exemplo, para as células-tronco hematopoéticas (CTHs), células-tronco embrionárias (CTEs) e células-tronco mesenquimais (CTMs). É importante destacar que a auto renovação das células-tronco pode ocorrer através de duas vias: a) divisão simétrica, quando há apenas geração de novas CTs mantendo um *pool* constante de CT e b) divisão assimétrica, no qual podem ser geradas tanto novas CTs, bem como, células progenitoras (CP) já comprometidas fenotipicamente (SANDERS *et al.*, 2006).

Acredita-se que células-tronco presentes nos diferentes tecidos tenham papel regenerativo quando estes sofrem uma lesão (BLAU *et al.*, 2001; FODOR, 2003).

1.2.2 Classificação das células-tronco

As CT podem ser classificadas em duas categorias, de acordo com seu estágio de desenvolvimento: em CTEs e células-tronco adultas (CTAs). As CTEs são definidas por sua origem, sendo derivadas da massa celular interna do embrião no estágio de blastocisto. Por outro lado, as CTAs mais facilmente disponíveis são as CTHs e, como principais fontes, tem-se a medula óssea e o sangue do cordão umbilical (KIRSCHSTEIN & SKIRBOLL, 2001; PRANKE, 2004).

As células-tronco ainda podem ser classificadas quanto ao seu potencial de diferenciação e plasticidade, ou seja, o potencial de formação de diferentes tipos de células maduras. Assim, essas CT são classificadas em totipotentes, pluripotentes e multipotentes (CAMASSOLA *et al.*, 2012). Células totipotentes são CT capazes de gerar todos os tipos de células, isto é, dar origem a um organismo inteiro, incluindo membranas extra-embriônicas e placenta. Uma célula é dita pluripotente quando é capaz de se diferenciar e gerar células das três camadas germinativas.

As CTEs são classificadas como pluripotentes (SOLTER, 2006), pois mesmo sendo possível obter um embrião e camundongos adultos das CTEs, estas não podem derivar as membranas extra-embriônicas e placenta (NAGY *et al.*, 1993). Quanto às células multipotentes, estas possuem a capacidade de se diferenciar em múltiplos tipos celulares, mas são restritas a uma única camada germinativa (TALÉNS-VISCONTI *et al.*, 2006; SNYKERS *et al.*, 2007).

As células multipotentes geram tipos celulares específicos de determinados tecidos do embrião e, em alguns casos, do adulto. Por outro lado, tem-se atribuído que CTs de adultos possuem menor potencial de diferenciação fenotípica. Entretanto, trabalhos recentes demonstram que a transdiferenciação é possível e pode, inclusive, fazer parte de sua fisiologia (AVOTS *et al.*, 2002; EGUSA *et al.*, 2005; ABEDI *et al.*, 2007). Essa classificação está em constante mudança com os avanços das pesquisas na área.

1.2.2.1 Células-tronco embrionárias

As CTEs formam-se da massa celular interna do blastocisto. Estas células foram isoladas pela primeira vez em 1981 (EVANS & KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981), quando a massa interna de células do blastocisto de camundongos foi cultivada sobre uma camada de

fibroblastos de embrião de camundongo, e mantido por um meio de cultura convencional complementado com soro fetal bovino. A adição de uma citocina chamada Fator Inibitório de Leucemia (LIF) possibilitou o cultivo das CTE sem que elas perdessem seu estado indiferenciado, permitindo o cultivo de CTE em maiores proporções (SMITH *et al.*, 1988; WILLIAMS *et al.*, 1988). Finalmente em 1998, foi estabelecida a primeira linhagem de CTEs humanas (THOMSON *et al.*, 1998).

É conhecido que o transplante de CTE indiferenciadas leva à formação de teratomas. Portanto, a pré-diferenciação e a purificação das células são etapas essenciais para sua utilização em terapia celular (KLUG *et al.*, 1996). O uso terapêutico das CTEs tem limitações como a geração de uma quantidade de células suficientes para transplante, e ainda é preciso determinar a melhor maneira de aplicá-las, e como evitar a rejeição pelo sistema imunológico do paciente (ROBERTSON, 2001).

1.2.2.2 Células-tronco adultas

Células-tronco adultas (CTAs) são mais raras e podem ser originárias de uma variedade de tecidos como, por exemplo, cérebro, pele, músculo esquelético, sangue e polpa dentária (PRESNELL, PETERSEN & HEIDARAN, 2002; SPRADLING, DRUMMOND-BARBOSA & KAI, 2001; JIANG *et al.*, 2002). No entanto, a fonte mais caracterizada de células-tronco adultas é a medula óssea (ABUMAREE *et al.*, 2013). Ela possui uma população de diferentes tipos celulares, incluindo células-tronco hematopoéticas, fibroblastos, células endoteliais e adipócitos. Além desses tipos de células, a medula óssea também contém um conjunto de células-tronco não hematopoéticas com potencial para várias linhagens. Essas células-tronco são chamadas de células estromais mesenquimais (CTMs) (DEANS & MOSELEY, 2000; BIANCO & GEHRON, 2000). Na espécie humana, células que apresentam o marcador de membrana plasmática CD34⁺ têm sido utilizadas em tratamentos médicos e na pesquisa, como a principal fonte de CTHs tanto no transplante de medula óssea. Clinicamente, as células CD34⁺ têm importante papel nos enxertos para recomposição de atividade hematopoética na medula óssea. Geralmente sua utilização é feita após procedimentos quimio e/ou radioterápicos, em diversas patologias, como leucemias, imunodeficiências e doenças autoimunes, sendo uma ferramenta terapêutica importante na reconstituição hematopoética (GUNSILIUS *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2008).

Foi demonstrado que na placenta ocorre a produção de CTHs

durante o desenvolvimento embrionário (ALVAREZ-SILVA *et al.*, 2003), possibilitando a sua utilização como um tecido hematopoético. Na medula óssea, além das CTHs ela contém uma população de CTs aderentes ao plástico de cultura, capaz de induzir a hematopoese e de originar diferentes linhagens celulares, incluindo adipócitos, osteócitos, condrócitos, miócitos e astrócitos (JIANG *et al.*, 2002; TOCCI & FORTE, 2003). Estas células têm sido denominadas CTMs e foram isoladas de uma variedade de tecidos adultos incluindo fígado, medula óssea, polpa dentária, tecido adiposo, endotélio, músculo, fluido amniótico, placenta e cordão umbilical (GRONTHOS *et al.*, 2011; TANAKA & MIYAJIMA, 2012).

Tem sido demonstrado que CTMs humanas obtidas de medula óssea, placenta ou cordão umbilical, podem ser expandidas em cultura de células e originar, *in vitro* e *in vivo*, além das linhagens mesenquimais, mesoderme visceral, neuroectoderme e endoderme (COVAS *et al.*, 2003; ROMANOV *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2004). Estas células expressam marcadores genéticos de CTEs, como Oct4, Rex-1 e SSEA-1, e apresentam extensiva proliferação e potencial de diferenciação em múltiplas linhagens em ensaios clonais (POCHAMPALLY *et al.*, 2004; YEN *et al.*, 2008). Os autores não observaram indícios de anormalidades citogenéticas, bem como fusão e transformação celular, isto é, uma metaplasia que é uma alteração reversível quando uma célula adulta, seja epitelial ou mesenquimal, é substituída por outra de outro tipo celular. Deste modo, sugere-se que CTs de tecidos específicos possam sofrer reprogramação genética *in vitro* e *in vivo* desde que estimulados.

Uma alternativa para obtenção de CTHs e CTMs tem sido o cordão umbilical de recém-nascidos (BARKER & WAGNER, 2002; LEE *et al.*, 2004). O uso de CTs obtidas de cordão umbilical, além de representar uma opção para quem não tem doador compatível, ainda reduz em até 50% as chances de rejeição. A desvantagem deste tipo de transplante é que ele só pode ser feito em crianças ou adultos com baixa massa corporal, até 40 kg, devido à baixa quantidade de CTs presentes no tecido, podendo não haver reconstituição adequada da medula do paciente (MINEGISHI *et al.*, 2001; BARKER & WAGNER, 2002; COHEN & NAGLER, 2004; TSE & LAUGHLIN, 2005).

Em 2000, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) inaugurou o Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP) e, em setembro de 2004, o Ministério da Saúde lançou oficialmente o Brasil Cord, uma rede nacional de armazenamento de sangue de cordão umbilical, através da rede Sistema Único de Saúde (SUS), visando

aumentar as chances de localização de doadores para os pacientes que necessitam de transplante de medula óssea em território brasileiro (SORAYA *et al.*, 2012).

1.2.2.3 Terapia celular com células-tronco adultas

No indivíduo adulto, diferentes tecidos possuem a capacidade de renovação ou ao menos de reparação total ou parcial, por exemplo, a epiderme e o sangue estão constantemente se renovando enquanto outros tecidos como o hepático podem ser reparados por completo, enquanto outros, como os tecidos nervoso e muscular, apresentam um potencial reduzido de reparação. Este potencial está relacionado à presença nestes tecidos de células-tronco que são as responsáveis pela reparação, proliferação e a capacidade de se diferenciar, nos diferentes tipos celulares encontrados nos tecidos de um indivíduo adulto, as chamadas células-tronco adultas. Dentre estas, podemos destacar as células-tronco hematopoéticas (CTH) e as células-tronco mesenquimais (CTM) (BYDLOWSKI *et al.*, 2009).

As células-tronco são células indiferenciadas, apresentam uma série de características que as tornam candidatas à utilização terapêutica. As principais características das células-tronco, como mencionado acima, possuem a capacidade de auto-renovação e de se diferenciarem em diversos tipos celulares. Assim podemos acreditar que CTs presentes nos diferentes tecidos tenham papel regenerativo quanto estes sofrem algum tipo de lesão. Entre os tecidos conhecidos por apresentarem CTs após o nascimento, a medula óssea foi a mais estudada, por muito tempo como fonte tanto células-tronco hematopoéticas como de células-tronco mesenquimais (BYDLOWSKI *et al.*, 2009).

Outro tecido que pode ser destacado como uma importante fonte de células-tronco é a placenta humana a termo por apresentar uma série de vantagens na sua utilização, entre as quais, a presença de células-tronco hematopoéticas, estas presentes desde o seu desenvolvimento, bem como, de células-tronco mesenquimais. Outras vantagens como à disponibilidade, à facilidade de obtenção da mesma após o parto e a quantidade de material disponibilizado. Com todas estas vantagens apresentadas a placenta poderá ser utilizada como fonte de células-tronco para a terapia celular (PAROLINI *et al.*, 2008).

A terapia com CTHs é uma das modalidades de terapia celular que mais tem conseguido eficácia ao longo dos anos no tratamento de doenças malignas e benignas em crianças e adultos. O transplante de

medula óssea, por exemplo, é rotineiramente usado no tratamento de linfomas e leucemias e certas condições não malignas, como imunodeficiências congênicas. O transplante de CTHs pode ser singênico (as células recebidas são de um irmão gêmeo, geneticamente idênticas às do receptor) ou alogênico (as células transplantadas não são geneticamente idênticas às do receptor). Os transplantes autólogos são os realizados com células do próprio receptor (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2009).

Os transplantes alogênicos guardam o risco de desencadearem uma reação enxerto *versus* hospedeiro, na qual linfócitos transplantados geram uma resposta imune contra os tecidos do receptor. Em certos casos, como no tratamento de neoplasias, essa reação aumenta a eficiência do tratamento na medida em que os linfócitos transplantados atacam as células neoplásicas remanescentes no receptor "enxerto *versus* neoplasia" (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2009).

Células-tronco é um dos elementos mais importantes na medicina regenerativa por causa de sua capacidade de auto-renovação, proliferação, bem como a diferenciação em linhagens celulares específicas. Com base em sua fase de crescimento, as células-tronco podem ser classificadas em células-tronco embrionárias (CTE) e células-tronco adultas (CTA). As CTE podem ser derivadas a partir de células totipotentes do embrião de mamífero e são capazes de proliferação ilimitada, *in vitro* (MORRISON *et al.*, 1997).

A compreensão detalhada de como a escolhe entre a auto-renovação da célula-tronco e o início da diferenciação é determinada, pode facilitar a expressão da população de células-tronco em cultura, enquanto mantendo ao mesmo tempo as características principais das células-tronco. Este é o primeiro passo para aproveitar o potencial das células-tronco adultas para substituição de tecidos e também, na terapia gênica (JONES & FULLER, 2009).

Células-tronco adultas podem ser encontradas em vários tecidos, incluindo o sangue do cordão umbilical, que possuem a capacidade de manter e reparar o tecido (CAPLAN, 2007). A CTE humana é capaz de manter o potencial para formar todas as três camadas germinativas (endoderme, mesoderme e ectoderme) (THOMSON, 2007). No entanto, o uso de CTE encontra alguns problemas relacionados a questões, como a rejeição das CTE, o risco de formação de tumores bem como as questões de ordem ética e religiosa (HIPPE & ATALA, 2008; PREYNAT-SEAUVE & KRAUSE, 2011). As CTMs são células-tronco adultas geralmente usadas na medicina regenerativa e elas podem ser isoladas a partir da medula óssea

(CRISAN *et al.*, 2008).

Estas CTMs apresentam propriedades multipotentes, podem se diferenciar em diferentes tipos de células tais como o músculo (WAKITANI *et al.*, 1995), da cartilagem (BARRY *et al.*, 2001) e do coração (TOMA *et al.*, 2002). Além disso, CTMs foram também capazes de diferenciar em células neurais ou epitélios de que não são de origem mesodérmica (SANCHEZ-RAMOS *et al.*, 2000; PAUNESCU, *et al.*, 2007). Curiosamente, mesmo as células adultas diferenciadas elas podem ser reprogramadas em células com estado pluripotente devido à sua plasticidade e estas células são chamadas células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) (AMABILE & MEISSNER, 2009).

Quanto às células-tronco mesenquimais (CTMs) caracterizam por ser uma população de células multipotentes capazes de se diferenciar e produzir diferentes tipos de células necessárias num processo de reparação, como exemplo, os hepatócitos, os neurônios, as epiteliais, cardíacas, e outros tipos celulares (PITTENGER *et al.*, 1999). As CTMs apresentando esta característica de plasticidade levam a sugerir que esse tipo celular é o responsável pela manutenção de todos os tecidos do organismo (CAPLAN, 2009). Estas células tornaram-se alvo de inúmeras pesquisas em todo o mundo por fornecer perspectivas clínicas para o uso dessas células na terapia celular.

Placenta é uma fonte de MSCs com várias vantagens, incluindo fácil isolamento, sem procedimentos invasivos, baixo risco de infecção viral (HEMBERGER *et al.*, 2008; PAPPA & ANAGNOU, 2009). A placenta humana é composta de tecidos fetais e maternos (PAROLINI *et al.*, 2010). Ela possui CTHs e principalmente CTMs, e células-tronco epiteliais que foram obtidas a partir de várias partes da placenta, incluindo o sangue do cordão umbilical, (BROXMEYER *et al.*, 2006; MCNIECE *et al.*, 2002) do fluido amniótico, (BOSSOLASCO *et al.*, 2006; ROUBELAKIS *et al.*, 2007) da geleia de Wharton, (KARAHUSEYINOGLU *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2004) da membrana amniótica, (MARCUS *et al.*, 2008; TAMAGAWA *et al.*, 2007) membrana coriônica, (PORTMANN-LANZ *et al.*, 2006; SONCINI *et al.*, 2004) da decídua (BARLOW *et al.*, 2008; STRAKOVA *et al.*, 2008), e as vilosidades coriônicas (IGURA *et al.*, 2004; CHANG *et al.*, 2007).

A placenta representa uma significativa, valiosa e promissora fonte de células-tronco. As populações de células-tronco derivadas de tecidos da placenta humana (HEMBERGER *et al.*, 2008) são as células estromais mesenquimais corial e as células trofoblásticas corial, ambas demonstrando plasticidade variável (PAROLINI *et al.*, 2008).

1.3. Matriz Extracelular

A matriz extracelular (MEC) é uma estrutura complexa composta de proteínas estruturais como a fibronectina, colágenos, laminina, elastina, e também de proteínas funcionalmente especializadas como as citocinas, proteoglicanos, integrinas e fatores de crescimento (DARLEY *et al.*, 2008). É um componente estrutural de tecidos, com influência também no seu desenvolvimento e na sua fisiologia. Os tecidos não são compostos somente de células com sua composição interna de filamentos do citoesqueleto, mas também de uma MEC que elas secretam, e é esta matriz que fornece a sustentação aos tecidos (HYNES, 2009; ALBERTS *et al.*, 2011). A MEC desempenha funções não só de resistência estrutural, mas também de suporte para os tecidos e órgãos. Participa, também, da organização e coordenação das funções celulares nos tecidos, sendo assim, é através da MEC que ocorrem os processos celulares como a migração, a adesão e os processos de transdução de sinal que regulam a proliferação celular e a expressão gênica nas células de um determinado tecido. Além de todos estes mecanismos regulatórios da MEC, também estão envolvidas as moléculas de adesão celular, as quais ligam as células com os componentes da MEC (CHEN *et al.*, 2007).

CASTELLUCCI *et al.* (1990) mostraram que a MEC, particularmente o colágeno, influencia a síntese de produtos trofoblásticos. Por exemplo, tem sido relatado que o colágeno IV dirige a diferenciação de CTEs de linhagens mesodérmicas em camundongo e humano (SCHENKE-LAYLAND *et al.*, 2007). A MEC também desempenha um papel fundamental na arquitetura estromal (DEMIR-WEUSTEN *et al.*, 2007) e células mesenquimais residentes contribuem significativamente para a sua produção. Portanto, evidências confirmam que a MEC influencia grandemente o comportamento e a função celular (KOHLEN *et al.*, 1996).

1.3.1 Colágenos

Moléculas de colágenos (COL) pertencem a uma família de glicoproteínas fibrosas que ocorrem em todas as células eucariontes (exceto nos protozoários), sendo o componente predominante da matriz extracelular em muitos organismos. Apresentam-se de diversas formas e são encontradas em todos os tecidos animais multicelulares. Cerca de 20 genes codificando formas variantes do colágeno necessário para diferentes tecidos são encontrados nos mamíferos. Os colágenos são as

proteínas mais importantes no osso, no tendão e na pele e constituem 25% do total da massa proteica dos mamíferos, mais do que qualquer outro tipo de proteína fibrosa (ALBERTS *et al.*, 2011).

Os diferentes tipos de colágenos e suas localizações são: a) Colágenos fibrilares - Tipos I, II, III, V e XI, constituídos por moléculas que formam fibrilas com estriações em diversos tecidos; b) Colágenos associados a fibrilas – Tipos IX, XII e XIV, estão associados aos colágenos fibrilares; c) Colágenos de cadeia curta – Tipos VIII e X fazem parte de matrizes extracelulares específicas; d) Colágenos das lâminas basais – compreendem os vários tipos de moléculas de colágeno conhecido como do Tipo IV; e, e) Outros tipos de colágenos – Tipos VI, VII e XIII, formam estruturas especializadas em vários tecidos. O Tipo VI forma microfibrilas e estão associados aos colágenos fibrilares; o Tipo VII forma as fibrilas de ancoragem (MYLLYHARJU & KIVIRIKKO, 2001).

Moléculas de colágeno são os maiores componentes estruturais das membranas fetais, como mostrado nos estudos de extração e caracterização (BURGESON *et al.*, 1976; KANAYAMA *et al.*, 1985), em como, pela imunohistoquímica (APLIN & CAMPBELL, 1985; DIEROM & BRYANT-GREENWOOD, 1991; MALAK *et al.*, 1993). É também um componente da matriz extracelular (AYAD *et al.*, 1994; PROCKOP & KIVIRIKKO, 1995), bem como, associados com outros componentes da matriz extracelular (YURCHENCO *et al.*, 1994).

A maior resistência à tração das membranas fetais e placenta se deve provavelmente pela presença de colágenos intersticiais, tipo I e III, juntamente com quantidades menores de colágenos do tipo V, VI e VII na camada compacta abaixo da membrana basal amniótica (MALAK *et al.*, 1993). Relatos mostram moléculas de colágenos do tipo I e III associados com células citotrofoblásticas (APLIN & CAMPBELL, 1985). O colágeno do tipo IV foi identificado em associação com estas células em todos os estudos realizados (APLIN & CAMPBELL, 1985; DIERON & BRYANT-GREENWOOD, 1991; MALAK *et al.*, 1993).

Na placenta humana, a presença e a distribuição de moléculas de colágenos, estão nas diferentes regiões do órgão como no âmnion, no córion e na decídua. Também nestas regiões há presença de moléculas como proteoglicanos, integrinas, fibronectinas, lamininas e outras (BRYANT-GREENWOOD, 1998).

O colágeno IV está geralmente associado com a membrana basal e a membrana do córion, mostrando a grande distribuição por todos estes tecidos. Tem sido sugerido que o colágeno tipo IV também tem papel no desenvolvimento e manutenção da estrutura da matriz

(MODESTI *et al.*, 1989). O colágeno tipo VI também está presente no tecido da placenta humana (MALAK *et al.*, 1993).

Resultados obtidos nas últimas décadas mostraram que a função dos colágenos não se limita apenas ao de suporte e resistência mecânica, mas também estão envolvidos nos fenômenos de adesão e diferenciação celular (BARROS *et al.*, 2011).

1.3.2 Fibronectina

A fibronectina (FN) é uma importante classe de glicoproteínas adesivas, sintetizadas por uma ampla variedade de tipos de células e que desempenham um papel relevante em muitas interações entre células e outras moléculas da matriz extracelular (HUMPHRIES & YAMADA, 1990; YAMADA, 1991).

A fibronectina é constituída de duas cadeias polipeptídicas semelhantes, que se ligam por pontes de dissulfeto nas regiões próximas à região C-terminal, com peso molecular de cerca de 250 kDa (ERICKSON *et al.*, 1981). Apesar de a fibronectina ser codificada por um único gene (KORNBLIHTT *et al.*, 1983; TAMKUM *et al.*, 1984), existem cerca de 20 cadeias diferentes, com diferentes sequências de aminoácidos, que são geradas por unidades diferentes de uma mesma molécula de RNAm (YAMADA, 1991).

As cadeias polipeptídicas da fibronectina caracterizam-se por conter pequenas sequências repetitivas de aminoácidos, cuja similaridade permitiu classificá-las como do tipo I, II ou III (PETERSEN *et al.*, 1983). Análises por fragmentação proteolítica e através de técnicas que utilizam DNA recombinante mostraram que cada cadeia polipeptídica possui pelo menos cinco domínios estruturais e funcionais, separados por regiões flexíveis. Cada domínio é formado por um conjunto de sequências do tipo I, II, ou III que, por serem sítios de alta afinidade de ligação para macromoléculas da matriz extracelular e para receptores de superfície celular, estão envolvidos em diferentes funções (YAMADA, 1991).

A maioria das células adere à fibronectina por meio de receptores específicos, que reconhecem um domínio localizado na região central da cadeia, cuja estrutura mínima, mas crucial para o reconhecimento celular, é o tripeptídeo Arg-Gly-Asp (RGD) (PIERSCHBACHER & RUOSLAHTI, 1984; YAMADA, 1991).

Outros domínios da molécula, no entanto, podem ser reconhecidos por diferentes tipos celulares. Células embrionárias da crista neural e alguns linfócitos são extremamente hábeis para aderirem

a uma região conhecida como IIICS da fibronectina, enquanto que fibroblastos o fazem por outras regiões (MOULD *et al.*, 1991).

A síntese temporal e espacialmente controlada de moléculas de fibronectina, que apresentam diferentes sítios de ligação, pode ser reconhecida por diferentes tipos celulares e, desta forma, contribuir com diferentes comportamentos celulares durante o desenvolvimento ou a fisiologia de um órgão (GUAN *et al.*, 1990). A expressão da fibronectina em diferentes sistemas *in vivo* e *in vitro* tem enfatizado seu papel em estimular a migração e a diferenciação de inúmeros tipos celulares durante o desenvolvimento embrionário, nos processos de reparo tecidual, onde sua associação com moléculas de fibrina funciona como um substrato para a migração celular e, como moléculas de adesão para células e outras moléculas (YAMADA, 1991).

Na cicatrização, a fibronectina e suas interações com integrinas exercem papel ímpar na adesão de plaquetas à matriz danificada de colágeno, além de facilitar a migração e adesão de fagócitos e viabilizar a matriz para a proliferação celular. Fibronectina ainda parece estar relacionada ao aumento da aderência e quimiotaxia, dependentes da manutenção da estrutura do citoesqueleto (GARDNER & HYNES, 1985).

É importante na neovascularização, estimulando a migração de células endoteliais e servindo de guia para o movimento de células epiteliais através do tecido de granulação. A fibronectina também tem sua importância nos processos de embriogênese, regeneração de fibras nervosas e migração de células tumorais (MOHRI, 1996).

No período embrionário, células germinativas primordiais de anfíbios e aves atravessam um ambiente rico em fibronectina durante sua migração para a crista gonadal (HEASMAN *et al.*, 1981; ALVAREZ-BUYLLA & MERCHANT-LARIOS, 1986). Notável quantidade de fibronectina também aparece associada à lâmina basal durante a neurulação, tornando-se, ao que tudo indica uma via de migração para células da crista neural (DUBAND & THIERY, 1982).

A importância da fibronectina durante o desenvolvimento embrionário torna-se particularmente evidente quando as interações celulares com este componente são bloqueadas utilizando-se, por exemplo, anticorpos específicos que mascaram os sítios de ligação. No timo, este protocolo impede a diferenciação de células T (SAVINO *et al.*, 1993). Estudos de imunolocalização na placenta mostram que a fibronectina tem uma distribuição bastante generalizada na matriz extracelular, a partir da decidua parietal à membrana basal amniótica (LOCKWOOD *et al.*, 1991).

1.3.3. Laminina

A laminina (LN) é uma das primeiras moléculas da matriz extracelular que aparecem em mamíferos, no início do desenvolvimento, em um estágio em que o embrião possui apenas 4–8 células. A ausência ou pouca quantidade de colágeno IV na lâmina basal durante o desenvolvimento embrionário faz com que a laminina seja o principal constituinte desta estrutura (TIMPL *et al.*, 1979; ELKBLOM, 1981).

Semelhante a outras moléculas de matriz extracelular, a laminina também possui domínios funcionais globulares que se ligam ao colágeno IV, heparan sulfato e outros receptores de superfície celular (TERRANOVA *et al.*, 1980; TIMPL *et al.*, 1983). Por possuir vários domínios de ligação para estes componentes de matriz extracelular presentes na lâmina basal, a molécula tem um importante papel na organização desta estrutura. A laminina exerce, também, papel crucial na adesão, proliferação, migração e diferenciação celular em diversos tipos celulares (COLAGNATO & YURCHENCHO, 2000).

A interação entre células e moléculas da MEC como a fibronectina e colágeno tipo I tem um papel importante na diferenciação de CTM nos vários tecidos, como o tecido ósseo (SALASZNYK *et al.*, 2004). A relação entre células-tronco mesenquimais com moléculas de MEC como a laminina, também é suficiente para a induz da osteogênese (KLESS *et al.*, 2005).

A laminina é um excelente substrato para células da crista neural *in vitro* e a associação de migração de células da crista neural com membranas basais suporta um papel fisiológico para laminina em dirigir a migração de células da crista neural (DUBAND & THIERY, 1987; ERICKSON, 1988).

1.4 Nicho celular

O termo “nicho” foi proposto por SCHOFIELD (1983), que consiste de uma unidade estrutural interativa, composto por células (tanto pelas próprias células-tronco e sua progênie, quanto por células de outras linhagens) e moléculas da matriz extracelular que suportam e mantêm o fenótipo final das células-tronco, de forma a manter a homeostase do tecido (MOORE & LEMISCHKA, 2006).

Nichos são microambientes altamente regulados que controlam o balanço entre auto-renovação e diferenciação de células-tronco presentes nos tecidos adultos e o maior componente do nicho é a MEC. Eles fornecem às células-tronco proteção a estímulos de diferenciação,

de apoptose e qualquer outra natureza que possa eventualmente afetar os estoques de células-tronco presentes no tecido. O nicho oferece também um ambiente que evita a proliferação exagerada das células-tronco, o que poderia levar à formação de tumores. Entretanto, as células-tronco devem ser periodicamente ativadas de forma a produzir células maduras necessárias para a renovação tecidual. Dessa forma, um nicho funcional precisa ser capaz de manter o balanço entre a quiescência e a ativação das células-tronco (MOORE & LEMISCHKA, 2006).

A manutenção das CTAs depende de um microambiente. Estas células estão protegidas em nichos específicos, compostos de outros tipos celulares que secretam matriz extracelular e fatores de sinalização que, em combinação com suas características intrínsecas, definem suas propriedades e seu potencial. A importância do nicho para a biologia das CTAs tem se tornado cada vez mais evidente, sendo hoje aceito que elas se mantêm como CTs apenas quando ligadas ao seu nicho; ao deixá-lo, as células entram na via de proliferação e diferenciação (GARCIA & FERNÁNDEZ, 2012).

Os componentes regulatórios do nicho são fortes indutores na manutenção da auto-renovação de CTs através da produção de fatores de crescimento e moléculas de matriz extracelular (TAICHMAN, 2005). Para a manutenção dos níveis de renovação de CTs nos tecidos também deve ser considerado que, normalmente, a composição molecular tem relevância na manutenção do *pool* de CTs, possivelmente atuando como um reservatório dessas células no possível reparo de lesões (CZYŻ & WOBUS, 2001; JONES & WAGERS, 2008; FUCHS, 2009). Os efeitos do nicho na manutenção de CTHs têm sido largamente descritos por meio da interação destas com um estroma hematopoético. Tem sido apontado um papel relevante de CTMs na organização do nicho hematopoético através da produção de células organizadoras do microambiente, assim como por produção de citocinas (DAZZI *et al.*, 2006).

As CTMs encontram-se em muitos, se não em todos, tecidos e órgãos, um sistema complexo e altamente regulado para assegurar que a células-tronco sejam mantidas em um estado indiferenciado, proliferando em uma taxa adequada para as suas necessidades. Estes sistemas regulatórios são especialmente organizados, os chamados nichos de célula-tronco (ZHANG *et al.*, 2003).

Entretanto, para que as CTMs diferenciem para os fenótipos observados no nicho medular (adipócito, conjuntivo e endotelial), é necessária uma organização específica de moléculas de MEC e citocinas, que gerem um nicho de diferenciação competente para

suportar e manter o fenótipo final, que por sua vez poderá organizar um ambiente propício para a manutenção de CTHs (KOLF *et al.*, 2007). Esta cascata de eventos, ou hierarquia de nichos, ainda é mal compreendida.

Foi descrito que CTs podem ser produzidas na placenta, durante o desenvolvimento, assim como em nascidos a termo (ALVAREZ-SILVA *et al.*, 2003; ANKER *et al.*, 2004; GEKAS *et al.*, 2005; MIKKOLA *et al.*, 2005; CHIEN *et al.*, 2006; YEN *et al.*, 2008). Entretanto, poucos trabalhos procuram descrever a organização molecular do nicho organizador de CTs neste tecido. Os estudos parecem sugerir que a capacidade de atuar como nicho, pelo menos para CTHs, deriva da produção local de fatores hematopoéticos (GEKAS *et al.*, 2005; LI, 2005; MIKKOLA *et al.*, 2005). Entretanto, a organização de proteoglicanos, fibras de colágeno e outras moléculas para a manutenção do nicho de CTs na placenta é pouco estudado.

No microambiente das células-tronco existem também, mais componentes regulatórios do nicho os sinais químicos e/ou biológicos que atuam como indutores da diferenciação de MSCs. Fatores como TGF- β (o mais potente deles), IGF-1, bFGF, EGF, PDGF, Wnt e ascorbato estimulam o potencial de diferenciação das MSCs em condrócitos. Várias vias de sinalização intracelulares, como MAPK e Smads, são ativadas, induzindo vários fatores de transcrição (SOX9,SOX5,SOX6), levando à produção de proteínas de matriz celular, incluindo colágeno tipo II, agregam, requeridos para a formação de cartilagem (HASHIMOTO *et al.*, 2006). Além dos já mencionados acima, outros fatores como o BFGF ou Wnt podem estimular o potencial de diferenciação osteogênico ou neural. O meio suplementado com 1,25-diidroxivitamina D3, 2-fosfato-ascorbato e β -glicerofosfato pode induzir a diferenciação osteogênica (KULTERER *et al.*, 2007).

VEGF, por sua vez, estimula o potencial de diferenciação endotelial. Dexametasona, juntamente com isobutil-metilxantina, insulina e indometacina, estimulam o potencial adipogênico (DE GEMMIS *et al.*, 2006); vacúolos ricos em lípidios, acumulam-se no interior das células, que passam a expressar PPAR- γ 2. Meios com baixa concentração de soro contendo dimetil-sulfóxido (DMSO) induzem a diferenciação em células semelhantes a neurônios (ANISIMOV *et al.*, 2007). 5-azacitidina, anfotericina B e hidrocortisona (AMADO *et al.*, 2005) diferenciam as MSCs em mioblastos, em algumas situações são capazes de se fundir em miotúbulos e exibir batidas rítmicas. Nicotinamida e β mercaptoetanol induzem diferenciação de MSCs de ratos em células β de ilhotas pancreáticas.

Apesar de todos os avanços, já realizados na busca do entendimento do microambiente das células-tronco, muitas investigações ainda precisam ser realizadas, para melhor compreender os eventos que ocorrem nesta complexa estrutura que os nichos de células-tronco apresentam.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a organização do nicho organizador de células-tronco no tecido placentário.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar histológica, histoquímica e imunohistoquimicamente, a placenta;
- Analisar a distribuição de moléculas da substância fundamental amorfa;
- Identificar e avaliar a distribuição de CTMs e CTHs nas diferentes regiões da placenta associadas com diferentes tipos de moléculas de MEC;
- Caracterizar ultraestruturalmente, por microscopia eletrônica de transmissão, a placenta para caracterizar os nichos celulares.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção da placenta humana

Em colaboração com o Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC), as placentas de recém-natos a termo (39 – 41 semanas), em um total de 10, foram obtidas de gestantes que doaram as placentas mediante a assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O termo procurou esclarecer às gestantes e aos familiares a respeito do estudo. Após os partos, as placentas foram imediatamente transferidas para o Laboratório de Células-Tronco e Bioengenharia (LCTB) BEG/CCB/UFSC, em sacos plásticos flexíveis e acondicionadas em um recipiente térmico (4°- 8°C) contendo uma solução fisiológica de cloreto de sódio PA a 0,9% (Vetec®) e gelo.

O tempo de duração entre a coleta das placentas e o início do seu processamento foi de no máximo 60 minutos. Todos os procedimentos do estudo foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC, sob o número de protocolo 198/03-CEPSH/PRPG.

3.2 Coleta e processamento do material biológico

Antes de iniciar a coleta das amostras, as placentas foram examinadas macroscopicamente, após a retirada do excesso de sangue. Esta avaliação teve como objetivo verificar as condições destes órgãos, assim, poder aplicar as várias técnicas previstas para este estudo. Na avaliação, foram utilizados os seguintes parâmetros: aspectos das faces fetal e materna e a presença ou não de hematomas. Não foram identificados a presença de hematomas nas amostras (DRISCOLL & LANGSTON, 1991).

Assim, as amostras do tecido foram coletadas e processadas. A escolha das amostras, isto é, dos cotilédones, foi realizada de forma aleatória. A figura 2 mostra a face materna de uma placenta, onde o círculo menor e descontínuo delimita um cotilédone, e o círculo maior e contínuo indica a área onde as amostras foram selecionadas e coletadas. A figura 3 mostra um corte transversal da placenta, indicando as regiões das vilosidades coriônicas e da decídua basal. Os cotilédones escolhidos foram imediatamente seccionados com uma lâmina de bisturi descartável (Maxicor®). Para facilitar a operação, as amostras foram banhadas constantemente com uma solução fisiológica de cloreto de

sódio PA a 0,9% (Vetec®). Os cortes foram realizados de maneira delicada e firme por meio de um único movimento, produzindo o mínimo possível de pressão e, portanto, menos dano ao tecido.

Amostras de 12 (doze) fragmentos de aproximadamente 1-2 cm², de 4 (quatro) cotilédones de cada placenta, foram coletadas das regiões da decídua basal e das vilosidades e imediatamente lavadas com uma solução fisiológica (PBS 1X) para remover o excesso de sangue e fixadas com paraformaldeído 2,5% (Sigma®), pH 7,2, em tampão fosfato a 0,1M, a 4°C, durante 48 horas. A seguir, foram lavadas com água corrente durante 2 horas e rapidamente com água destilada, desidratadas em uma série de soluções aquosas de concentrações crescentes de álcool PA (Vetec®) 1X 70%, 1X 80%, 1X 90%, 2X 100% e 2X em xilol (Vetec®).

Após a desidratação, os fragmentos foram incluídos em parafina purificada (Vetec®) em temperatura entre 56 a 58°C. Os blocos contendo os fragmentos de placenta foram seccionados com um micrótomo da Marca Leica *CE, Modelo rm2125RT*, com uma espessura de 5µm, utilizando navalhas de aço descartáveis (Leica 818®). Posteriormente, os cortes foram transportados para o banho Maria (BOEKEL) a 43°C. As lâminas com os cortes foram transferidas para uma estufa (MARCONI®, Modelo MA 032-2) a 37°C, por 24 horas para aumentar a adesão dos mesmos junto à lâmina.

Após desparafinados com xilol, os cortes foram reidratados em uma série de soluções aquosas de concentrações decrescentes de álcool PA 100%, 90%, 80% e 70%. Logo após, foram lavados com água corrente, corados, lavados novamente com água corrente, desidratados em uma série de soluções aquosas de concentrações crescentes de álcool PA 1X 70%, 1X 80%, 1X 90%, 2X 100% e 2X em xilol e montados em lâminulas de vidro em Entellan (Merck®).

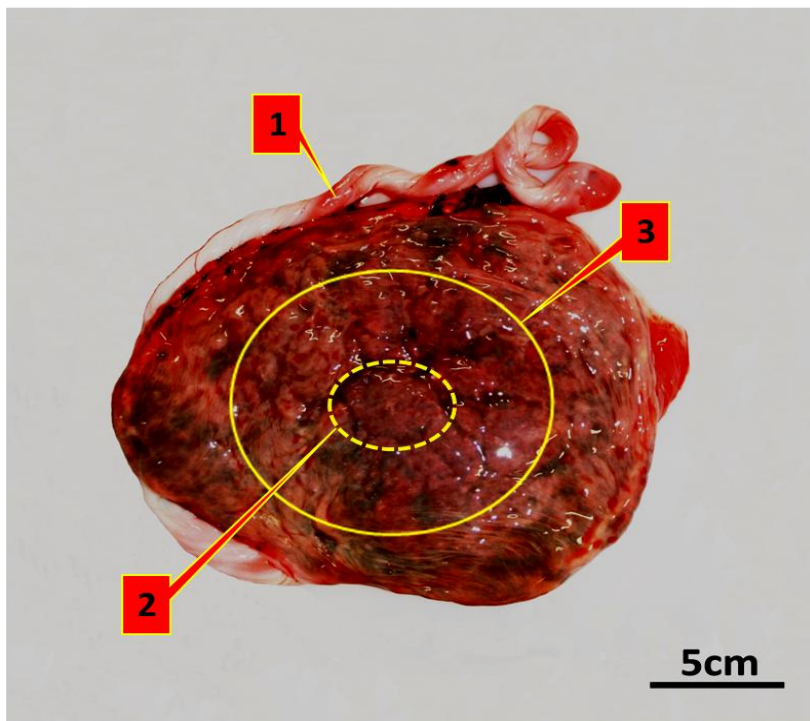


Figura 2. Face materna da placenta humana a termo. Cordão umbilical (1), o círculo descontinuo delimitando um cotilédone (2) e o círculo contínuo (3) indicando a área de estudo, onde as amostras do tecido foram selecionadas e coletadas. *Câmera-EOS digital “Canon”*.

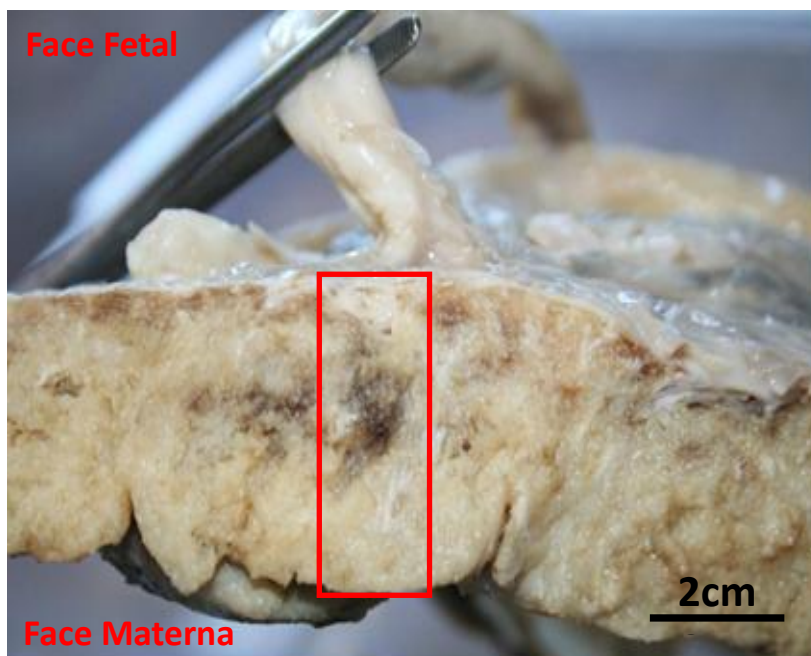


Figura 3. Corte transversal da placenta humana a termo. O retângulo indica as regiões das vilosidades coriônicas e da decídua basal. *Câmera-EOS digital “Canon”.*

3.3 ANÁLISE EM MICROSCOPIA DE LUZ

3.3.1 Colorações histológicas usuais

3.3.1.1 Coloração com Hematoxilina de Harris e Eosina Amarelada

A técnica de coloração com Hematoxilina de Harris e Eosina Amarelada, HE (BEÇAK & PAULETE, 1976) empregada nas amostras do tecido da placenta humana teve como objetivo identificar, principalmente, as características estruturais das vilosidades coriônicas e da decídua basal. As lâminas contendo as amostras de tecido com 5µm de espessura foram desparafinizadas 2X com xilol por 5 minutos cada. Hidratadas em uma série decrescente de álcool etílico (2X 100%, 1X 90%, 1X 80% e 1X 70%) por 5 minutos cada e lavadas com água corrente por aproximadamente 10 minutos. Após, as lâminas de vidro foram coradas com a solução de Hematoxilina de Harris (Merck®) por 5

minutos, lavadas rapidamente com água corrente por 5 a 10 minutos. Logo após, as lâminas foram coradas com eosina Amarelada (Vetec®) por 5 minutos, lavadas com água corrente por 5 a 15 minutos, desidratadas com álcool etílico 1X 95% e 1X 100% e 2X em xilol por 5 minutos cada (BEÇAK & PAULETE, 1976). As lâminas foram montadas em Entellan (Merck®). Após, as amostras foram analisadas e fotografadas ao microscópio de luz (ML) Olympus modelo BX41TF, equipado com câmera fotográfica Olympus modelo SC30.

3.3.1.2 Azul de toluidina

O corante azul de toluidina (ATO) foi utilizado para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia. As lâminas contendo as secções foram desparafinizadas 2X em xilol por 5 minutos cada. Hidratadas em uma série decrescente de álcool etílico (1X 100%, 1X 90%, 1X 80% e 1X 70%) por 5 minutos em cada álcool e lavadas em água corrente por aproximadamente 10 minutos. Após, foram coradas com ATO 0,5% (Merck®, Darmstadt, Germany), por 30 minutos e lavadas em água destilada. Após a secagem, as lâminas foram montadas em Entellan Merck® (SCHMIDT *et al.*, 2009). As amostras foram analisadas e fotografadas ao microscópio de luz (ML) Olympus modelo BX41TF.

3.3.2 Colorações histológicas especiais

3.3.2.1 Azul brilhante de Coomassie

O Azul brilhante de Coomassie (CBB) foi utilizado para identificar a presença de proteínas totais. As lâminas contendo as secções foram desparafinizadas 2X em xilol por 5 minutos cada. Hidratadas em uma série decrescente de álcool etílico (2X 100%, 1X 90%, 1X 80% e 1X 70%) por 5 minutos em cada álcool e lavadas com água corrente por aproximadamente 10 minutos. As lâminas contendo as secções foram coradas por 20 minutos com CBB (Sigma-Aldrich®), em placas de Petri. Posteriormente, foram lavadas na posição horizontal na solução de Clarke e rapidamente com água destilada. Após, a secagem ao ar, as lâminas foram montadas em Entellan, Merck® (SCHMIDT *et al.*, 2009). As amostras foram analisadas e fotografadas ao microscópio de luz (ML) Olympus modelo BX41TF.

3.3.2.2 Ácido Periódico de Schiff

O Ácido Periódico de Schiff (PAS) foi utilizado para identificar a presença de polissacarídeos neutros. As lâminas contendo as secções foram desparafinizadas 2X em xilol por 5 minutos cada. Hidratadas em uma série decrescente de álcool etílico (2X 100%, 1X 90%, 1X 80% e 1X 70%) por 5 minutos em cada álcool e lavadas rapidamente com água corrente. As secções foram oxidadas com solução aquosa de ácido periódico a 1% durante 20 minutos, lavadas com água corrente durante 15 minutos e em seguida, com água destilada e coradas com reativo de Schiff (Sigma-Aldrich®) por 20 minutos, protegidas da exposição à luz. Foram, então, lavadas novamente com água corrente por aproximadamente 15 minutos, em seguida, com água destilada, secas ao ar e montadas em Entellan (Merck®). (SCHMIDT *et al.*, 2010). Após, as amostras foram analisadas e fotografadas ao microscópio de luz (ML) Olympus modelo BX41TF.

3.3.2.3 Coloração Tricrômico de Mallory

A técnica Tricrômico de Mallory (MALLORY, 1897) empregada no tecido da placenta teve como objetivo, identificar a presença de fibras de colágeno em geral. Esta técnica consiste de 2g de uma solução de Orange G (Vetec®), 0,5g de Azul de Anilina Hidrosolúvel (MGM®) e 1g de ácido fosfotúngstico PA (Vetec®) em 100 mL de água destilada. As lâminas contendo as secções foram desparafinizadas 2X em xilol por 5 minutos cada, hidratadas em uma série decrescente de álcool etílico (2X 100%, 1X 90%, 1X 80% e 1X 70%) por 5 minutos em cada álcool e lavadas com água destilada por 5 minutos.

Os cortes histológicos foram mantidos nesta solução Tricromática de Mallory por 40 minutos e em seguida as lâminas foram lavadas com água destilada, contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 5 minutos, lavadas com água destilada e desidratadas com 2 banhos de álcool etílico 95% por 3 minutos cada, 1 banho de álcool etílico 100% por 3 minutos e 2 banhos com xilol por 5 minutos cada. As lâminas também foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 5 minutos, lavadas com água destilada e desidratadas. Logo após, as lâminas foram montadas em Entellan (Merck®) e analisadas e fotografadas ao microscópio de luz (ML) Olympus modelo BX41TF.

3.3.3 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) foi descrita pela primeira vez por ALBERTS H. COONS e seus colaboradores, em 1941. As etapas iniciais da marcação por imuno-histoquímica compreendem inicialmente a retirada de toda a parafina das amostras do tecido, com 2 banhos de xilol (Vetec®) de 20 minutos cada. Após, as amostras foram reidratadas em uma série decrescente de álcool etílico absoluto PA (Vetec®) 3X 100%, 1X 95% e 1X 85% durante 5 minutos em cada álcool, e lavadas duas vezes com água destilada por 5 minutos cada.

Logo após, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena que consiste de 1 banho com uma solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 - Vetec®) 3% preparada em metanol absoluto (Vetec®) no escuro por 20 minutos. Posteriormente, as amostras foram lavadas com 2 banhos de tampão PBS 1X (Vetec®) e uma vez com água destilada por 5 minutos cada. Para recuperar os antígenos mascarados pela fixação com paraformaldeído e inclusão do tecido em parafina, foi realizada a recuperação antigênica. Para isto, o berço com as lâminas foi colocado dentro dos potes com tampão citrato de sódio (CRQ®) a 0,01M, pH 6,0 (pré-aquecido) e mantidas em banho Maria por 40 minutos em temperatura constante de (93 a 96°C). Após, as lâminas foram retiradas do banho e deixadas por aproximadamente 60 minutos até atingir a temperatura ambiente (TA). Após, foram realizados 2 banhos de 5 minutos cada em tampão PBS (1X) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com 5% de soro fetal bovino em PBS (1X) durante 50 minutos em temperatura ambiente e, após, nova lavagem com 3 banhos de 5 minutos cada com tampão PBS (1X).

As amostras foram incubadas com os anticorpos primários específicos (Tabela 1), cobertas com parafilme e mantidas em overnight a 4°C em câmara úmida. Após este período, o parafilme foi removido em uma placa de Petry com uma solução de PBS (1X), lavadas 3 vezes com PBS (1X) por 5 minutos cada e incubadas com os anticorpos secundários (Tabelas 1), em câmara úmida por 2 horas a temperatura ambiente. Logo após, os cortes foram lavados 3 vezes com tampão PBS (1X) por 5 minutos cada. Incubadas com streptavidina-biotina-peroxidase (1:100, *Sigma®*, E2886) durante 40 minutos, seguido de 3 banhos de 5 minutos cada em tampão PBS (1X).

A revelação foi feita com DAB (1%) por até 5 minutos, seguida de 1 banho de 5 minutos com água destilada. Em seguida, foi realizada a contra-coloração com Hematoxilina por 3 minutos e interrompida a reação com água corrente por 5 minutos. Os cortes foram desidratadas

em uma série crescente de álcool etílico absoluto PA (Vetec®) (1X 85%, 1X 95%, 3X 100%) por 5 minutos em cada álcool e diafanizados 2 vezes com xilol por 5 minutos cada.

As lâminas com os anticorpos (Anti-CD73-IgG1, 1:100, Ab91086), (Anti-CD105-IgG1, 1:200, Ab114052), (Anti-colágeno tipo I- IgG, 1:100, Ab34710) (Anti-fibronectina-IgM, 1:50, F6140), e (Anti-laminina-IgG, 1:25, Ab11575) foram montadas em Entellan (Merck®). As amostras foram fotografadas ao microscópio Olympus BX41. Com relação ao anticorpo (Anti-CD34-IgG2a, 1:50, Ab8158), foi revelado com AlexaFluor®488 e utilizado DAPI.

As lâminas foram montadas em glicerol (Merck®) e analisadas e fotografadas ao microscópio de fluorescência Olympus IX71 (BEG/CCB/UFSC). O controle negativo também foi realizado em todas as marcações, omitindo-se os anticorpos primários nas lâminas testadas.

Ac. Primários	Ac. Secundários	Diluição	Códigos
CD34	AlexaFluor®488-Anti-IgG Rat	1:200	Invitrogen® A11006
CD73	Anti-IgG1-biotina-Mouse	1:200	Sourthen® 107008
CD105	Anti-IgG1-biotina-Mouse	1:200	Sourthen® 107008
Colágeno I	Anti-IgG-biotina-Rabbit	1:100	Invitrogen® B2770
Fibronectina	Anti-IgM-peroxidase-Mouse	1:100	Invitrogen® M31507
Laminina	Anti-IgG-biotina-GAR	1:100	Sigma® B7389

Tabela 1. Painel de anticorpos primários e secundários utilizados na caracterização das células e moléculas do tecido de placenta humana a termo.

3.4 Análise em microscopia eletrônica de transmissão

Para análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET), as amostras de aproximadamente 5 mm foram fixadas com solução de glutaraldeído 2,5 % e tamponadas em cacodilato 0,1M (pH 7,2), por 2 horas, no escuro, a 4°C. Após, 3 banhos em tampão cacodilato de 30 minutos cada, pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas,

desidratadas em série de soluções aquosas de concentrações crescentes de acetona 1X 30%, 1X 50%, 1X 70%, 1X 90% e 2X 100%, por um período de 15 minutos em cada concentração (SCHMDT *et al.*, 2010). Após a desidratação, as amostras foram embebidas em resina Spurr (SPURR, 1969), com a seguinte relação: (3:1) acetona e resina (12 horas); (2:1) acetona e resina (12 horas); (1:1) acetona e resina (12 horas); (1:2) acetona e resina (12 horas); (1:3) acetona e resina (12 horas); resina pura (12 horas) e resina pura novamente (12 horas).

As amostras do tecido foram polimerizadas na estufa a 70°C por 24 horas, e as secções ultrafinas de 70 nm foram realizadas com navalha de diamante em ultramicrotomo Power Tome XL e contrastadas com acetato de uranila 1% (no escuro) e citrato de chumbo 1% (na ausência de CO₂) (REYNOLDS, 1963). Os produtos utilizados nesta técnica foram da (EMS®). As amostras foram analisadas e fotografadas ao microscópio eletrônico de transmissão, modelo Jeol (JEM)1011 (JEOL Ltd., Tokyo, Japão, a 80 kV), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

4. RESULTADOS

4.1 Colorações histológicas

4.1.1 Coloração com Hematoxilina de Harris e Eosina Amarelada

Por meio da técnica de coloração com Hematoxilina de Harris e Eosina Amarelada (HE), foi possível diferenciar regiões basófilas coradas pela Hematoxilina e regiões acidófilas, coradas pela eosina. Nas células coradas com HE os ácidos nucleicos presentes nos núcleos são corados pela Hematoxilina, dando ao núcleo um tom azul púrpura. A eosina como é atraída pelos elementos básicos das proteínas do citoplasma das células, deixa-os corados de róseo a vermelho, como pode ser observado na figura 4 A, B, C, D e F e figura 5 A, B, C, D e F.

Através da coloração de HE, não só foi possível identificar a presença das vilosidades coriônicas e da decídua basal, bem como, o número, o tamanho, as formas e os espaços existentes entre elas. Outra característica estrutural importante identificada neste tecido foi com relação ao estroma, que é composto por diferentes tipos de células do tecido conjuntivo, fibras do tecido conjuntivo e substância fundamental. Além disso, o estroma contém vasos sanguíneos fetais de vários tipos e calibres.

A presença de vasos sanguíneos fetais nessas vilosidades pode ser um indicativo do tempo de gestação desta placenta, isto é, quanto maior o número e menor o calibre dos vasos sanguíneos, maior é o tempo de gestação. Outra característica que podemos destacar é com relação ao número e à quantidade de diferentes tipos celulares que compõem as vilosidades coriônicas do tecido placentário. Como exemplos, temos o sinciotrofoblasto, que consiste de uma camada epitelial que separa o interior das vilosidades do sangue materno.

O sinciotrofoblasto não é composto de células individualizadas, mas representa uma camada superficial multinucleada nas vilosidades coriônicas. Outro exemplo, o citotrofoblasto, consiste de células individuais ou agregadas, as chamadas células de Langhans, que são as células-tronco do sinciotrofoblasto, que mantém o crescimento e a regeneração desta última (Figura 4 F).

Na figura 5 E e F, observamos as regiões da decídua basal e das vilosidades coriônicas do tecido placentário. A decídua refere-se à camada funcional do endométrio (endométrio gravídico). Nesta região, podemos observar a presença de um grande número de células que extrapolam os limites das vilosidades da placenta e invade a decídua

basal neste tecido, as chamadas células citotrofoblásticas extravilosas. A maior parte das células desta região apresenta uma uniformidade na morfologia e em algumas dessas células, o núcleo não é visível (Figura 5 E e F).

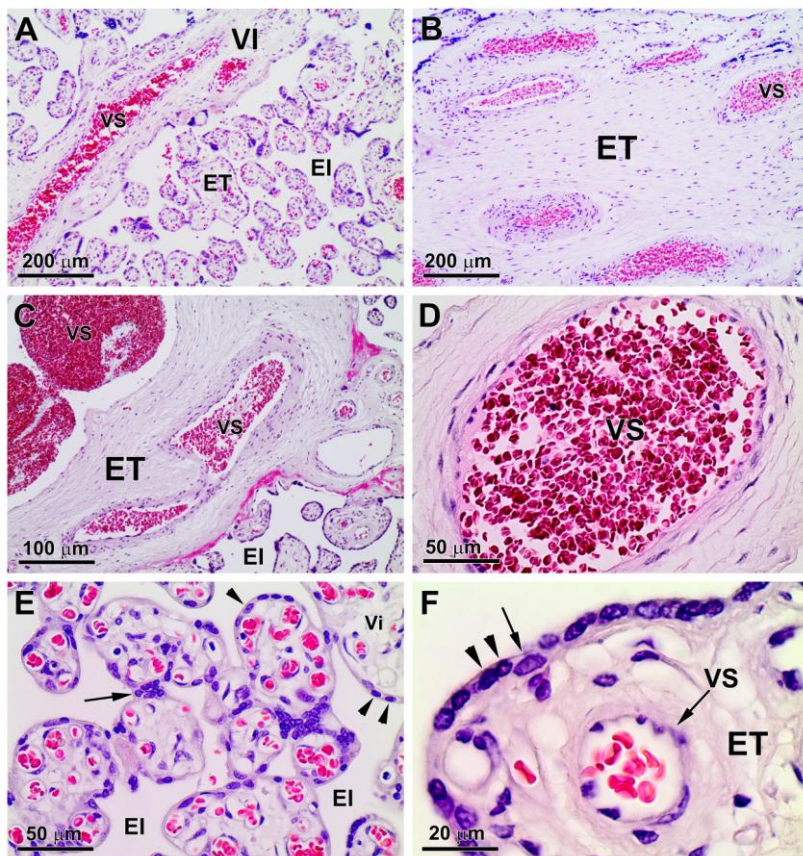


Figura 4. Seções histológicas de vilosidades coriônicas da placenta humana a termo. A: vilosidades coriônicas (VI), estroma (ET), vasos sanguíneos (VS), espaço interviloso (EI); B: vasos sanguíneos de diferentes formatos e calibres (VS); C: vaso sanguíneo (VS), estroma (ET) e espaço interviloso (EI); D: vaso sanguíneo (VS); E: sincitiotrofoblasto (cabeça de seta), nó sincicial (seta), espaço interviloso (EI); F: vaso sanguíneo (VS), estroma (ET), sincitiotrofoblasto (*cabeça de seta*) e célula citotrofoblástica (*seta*). Coloração: H e E.

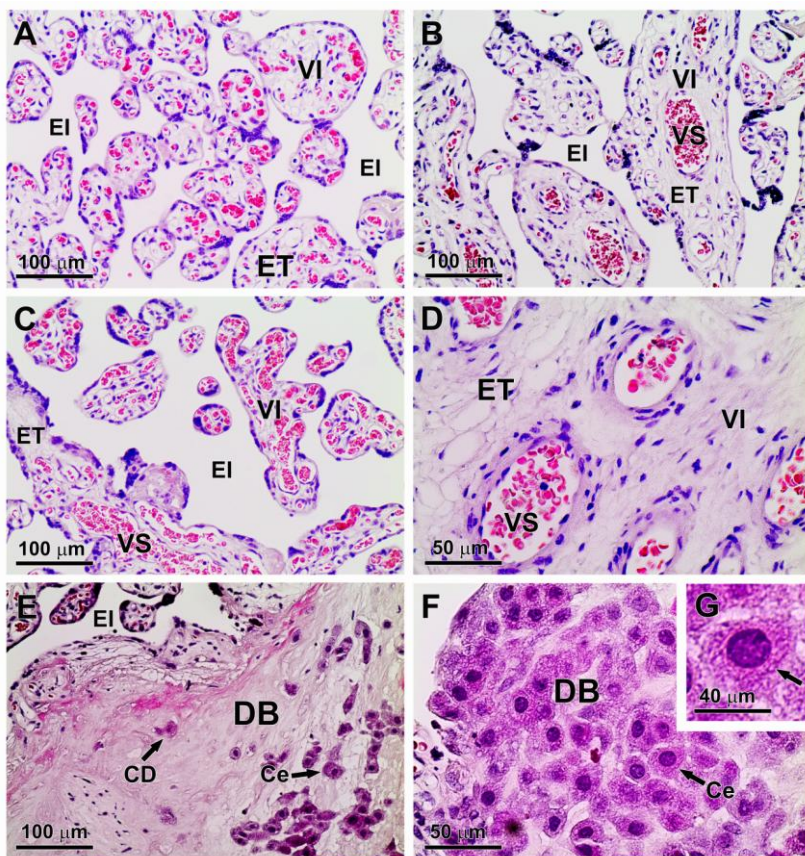


Figura 5. Seções histológicas de vilosidades coriônicas e da decídua basal da placenta humana a termo. **A, B, C e D:** vilosidades coriônicas (VI), vasos sanguíneos (VS) com plano de corte diferentes, número e calibres, estromas (ET) e espaço intervilloso (EI); **E:** decídua basal (DB) e células extravilosas (Ce) e célula decidual (CDe); **F:** decídua basal (DB); células extravilosas (Ce) e **G:** células extravilosas (inserto). Coloração: H e E.

4.1.2 Azul brilhante de Coomassie

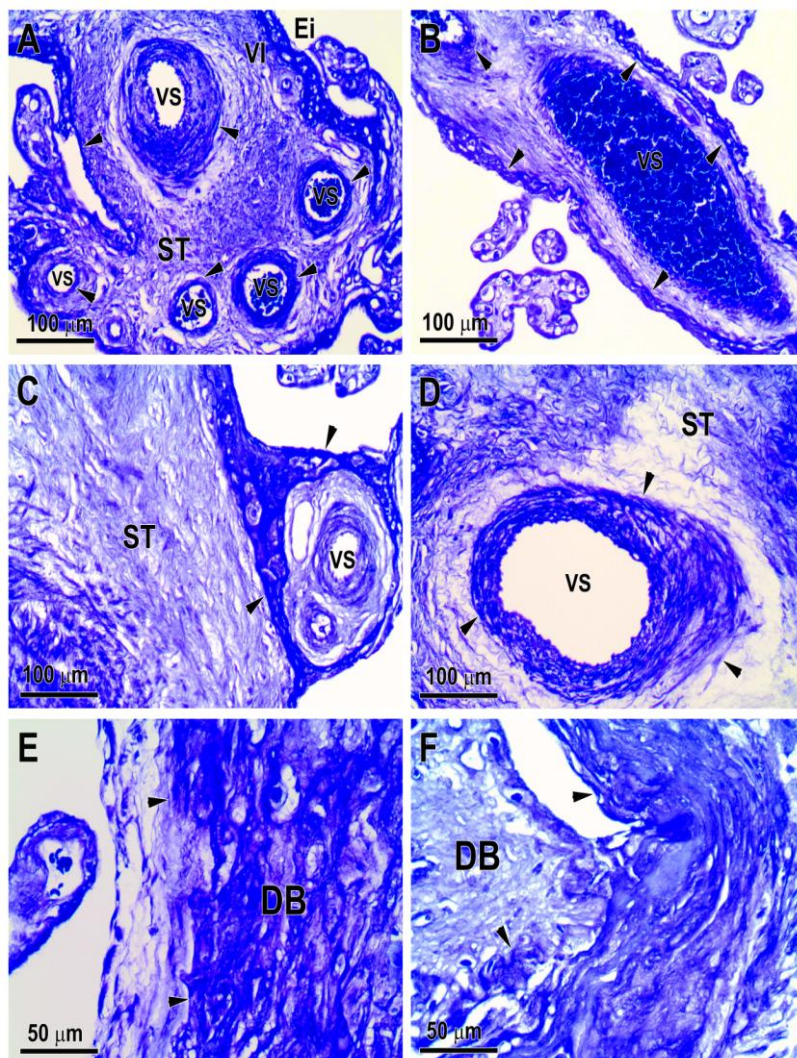


Figura 6. Seções histológicas de vilosidades coriônicas e da decídua basal da placenta humana a termo. A, B, C, D: vilosidades coriônicas (VI), proteínas totais (cabeça de setas), vasos sanguíneos (VS) apresentando diferentes formas, número, calibres; estroma (ST) e espaço intervilloso (EI); **F:** decídua basal (DB), vilosidade (VI) e proteínas totais (cabeça de setas). Coloração: Azul Brilhante de Coomassie.

Os resultados apresentados mostraram que as estruturas do tecido placentário, como um todo, reagiu fortemente com o CBB. Com isso, podemos constatar que o tecido da placenta apresenta, em praticamente toda sua extensão, uma grande quantidade de proteínas totais. Destaque este, para as regiões da parede dos vasos sanguíneos, do citotrofoblasto e do sinciotrofoblasto, onde as reações foram mais intensas, isto é, reagiram mais positivamente (Figura 6 A, B, C e D). Na região da decídua basal, também ocorreu uma positividade ao CBB, esta reação ocorreu na maior parte da decídua basal, com destaque para algumas regiões, onde a reação foi mais positiva (Figura 6 E e F).

4.1.3 Azul de toluidina

As secções contendo as vilosidades coriônicas e a decídua basal do tecido da placenta humana também foram coradas com a solução de Azul de toluidina (ATO). Este teste foi utilizado para identificar a presença de polissacarídeos ácidos (glicosaminoglicanos) neste tecido, através da reação de metacromasia. As lâminas, contendo o tecido placentário, reagiram mais fortemente com o Azul de toluidina nas regiões do sinciotrofoblasto e na parede dos vasos sanguíneos das vilosidades coriônicas (Figura 7 A, B, C, D, E). Na região da decídua basal, a reação também foi positiva ao ATO nas células deciduais, porém, na matriz extracelular esta reação foi menos intensidade, quando comparada com as regiões do sinciotrofoblasto e da parede dos vasos sanguíneos das vilosidades coriônicas (Figura 7 F). Estas mesmas regiões, também reagiram positivamente para o Azul Brilhante de Coomassie (Figura 6) e para o ácido periódico de Schiff (Figura 8).

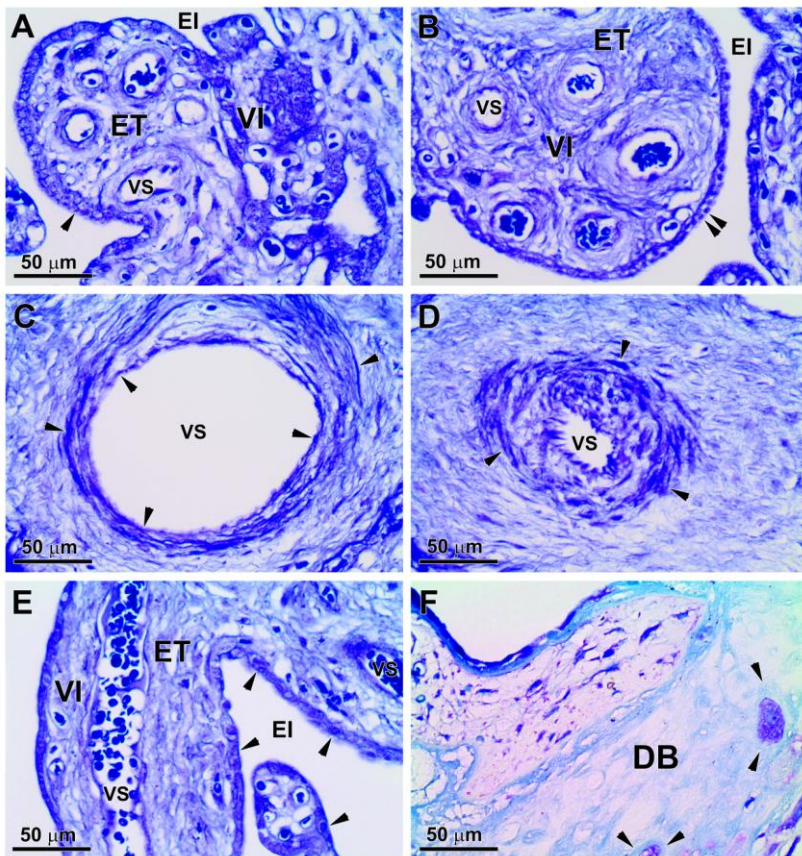


Figura 7. Seções histológicas de vilosidades coriônicas e da decídua basal da placenta humana a termo. A, B, C, D e E: vilosidades coriônicas (VI) e vasos sanguíneos (VS) apresentando diferentes formas, número, calibres e espaço intervilloso (EI); estroma (ST); no sinciotrofoblasto e na parede dos vasos sanguíneos a presença de polissacarídeos ácidos (cabeça de setas); **F:** decídua basal (DB) e célula decidual (cabeça de seta). Coloração: Azul de toluidina.

4.1.4 Técnica do Ácido Periódico de Schiff

Cortes histológicos das vilosidades coriônicas e da decídua basal da placenta humana foram submetidos à reação do Ácido Periódico de Schiff (PAS). Este teste foi realizado com objetivo de identificar a presença de polissacarídeos neutros (glicogênio, glicoproteínas, glicolípídeos e fosfatídeos) neste tecido. Os resultados

mostraram que a reação foi positiva em praticamente todas as regiões das vilosidades, mas houve uma positividade maior na região do sinciotrofoblasto.

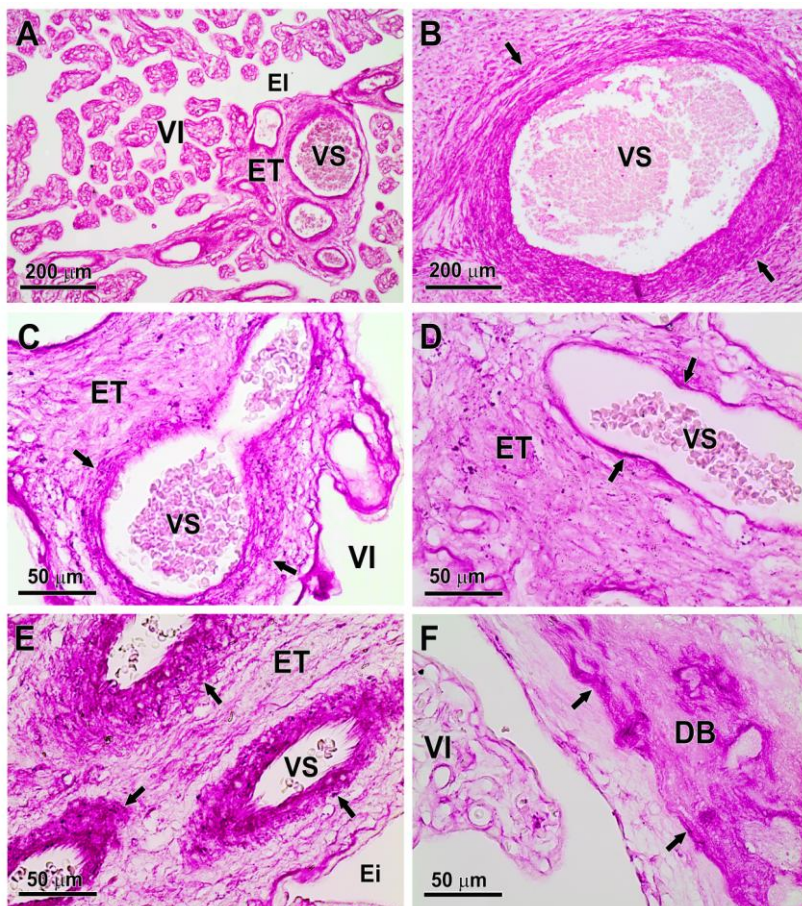


Figura 8. Seções histológicas de vilosidades coriônicas e da decídua basal da placenta humana a termo. A: vilosidades coriônicas, estroma (ET), espaço intervilloso (EI) e vaso sanguíneo (VS); B, C, D e E: vasos sanguíneos (VS) com diferentes formas e calibres, estroma (ET), e PAS (setas); A, C, D e E: estroma (ET); B, C, D e E: reação positiva para o PAS (seta). F: decídua basal (DB) reação positiva para o PAS (seta). Coloração: Ácido Periódico de Schiff.

Essa positividade foi ainda maior na parede dos vasos sanguíneos, que se mostram de vários tipos e calibres. Assim, podemos

constatar que as vilosidades coriônicas possuem polissacarídeos neutros distribuídos em praticamente todas as regiões das vilosidades coriônicas do tecido (Figura 8 A, B, C, D e E). Com relação à decídua basal, a presença de polissacarídeos neutros, também foi confirmada, em praticamente todas as regiões da decídua (Figura 9 F, G e H).

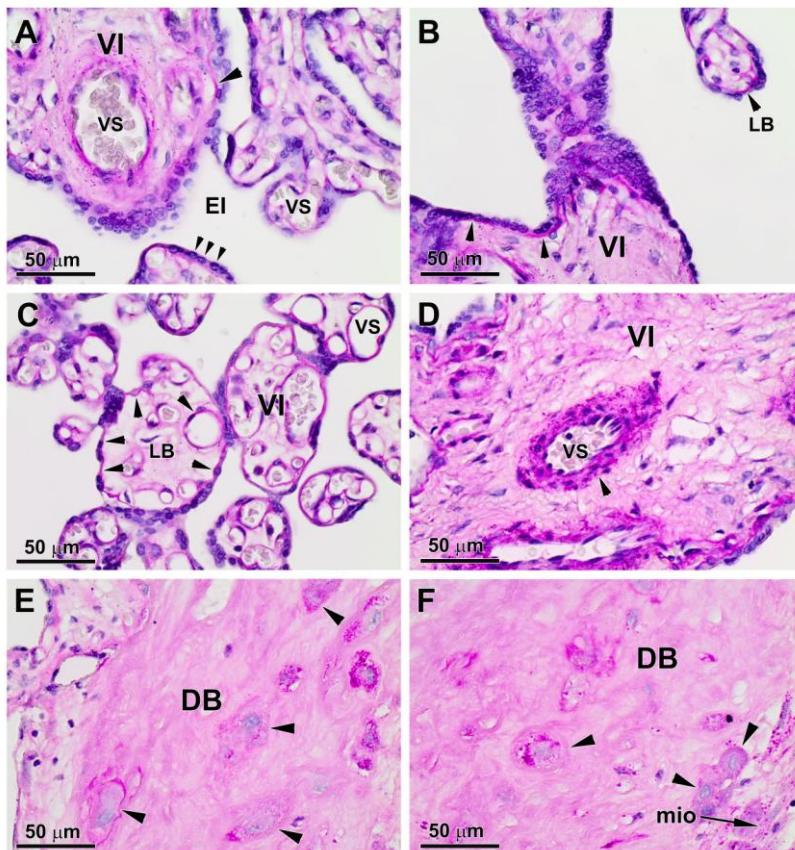


Figura 9. Seções histológicas de vilosidades coriônicas e da decídua basal da placenta humana a termo. A: vilosidades coriônicas (VI), vasos sanguíneos (VS) com diferentes formas e calibres, espaço intervilloso (EI), sincitiotrofoblasto (cabeça de seta pequena), lâmina basal (cabeça de seta maior); B e C: lâmina basal (cabeça de seta), vilosidade (VI), vaso sanguíneo (VS); D: vaso sanguíneo (VS), vilosidade coriônica (VI); E e F: decídua basal (DB), célula decidual (cabeça de seta); e miométrio (seta). Coloração: Ácido Periódico de Schiff e contra-coradas: Hematoxilina.

Cortes histológicos do tecido da placenta que foram submetidos à reação de PAS, também foram contra-corados com Hematoxilina. Com isso, foi possível, além de identificar a presença de polissacarídeos neutros, localizar os núcleos das células nas duas regiões do tecido das vilosidades coriônicas. Também, foi identificada nestes cortes do tecido, a presença da lâmina basal nas várias regiões das vilosidades coriônicas e na parede dos vasos (GOMEZ *et al.*, 2008) (Figura 9 A, B e C).

Os polissacarídeos neutros também foram confirmados na decídua basal, com destaque para as regiões mais próximas ao miométrio, onde a positividade foi maior, quando comparadas com as regiões próximas às vilosidades coriônicas (Figura 9 E e F). Estas mesmas regiões do tecido das vilosidades coriônicas e da decídua basal reagiram também positivamente para o CBB (Figura 6).

4.1.5 Técnica Tricrômico de Mallory

A técnica de Mallory revelou que fibras de colágeno estão presentes em grande parte nas regiões tanto das vilosidades coriônicas, bem como, na decídua basal. Esta técnica foi capaz de revelar a presença dos diferentes tipos colágenos, que estão presentes, tanto nas vilosidades coriônicas quanto na decídua basal, porém, sem a identificação de quais são os tipos de colágenos que compõem este tecido.

Além da identificação de moléculas de colágeno no tecido, foi possível também mostrar quais são as regiões do órgão que estas moléculas estão mais presentes, isto é, a sua localização e distribuição no tecido da placenta. Como podemos observar na Figura 10, moléculas de colágenos estão distribuídas praticamente em todas as regiões das vilosidades coriônicas e na decídua basal.

A presença dessas moléculas é mais evidente principalmente na parede dos vasos sanguíneos e no sinciciotrofoblasto das vilosidades. O mesmo ocorre na matriz extracelular, que ocupa grande parte da região da decídua basal do tecido (Figura 10 H). O estroma das vilosidades possui um grande número de vasos sanguíneos, de diferentes formas e calibres. Na parede destes vasos encontramos uma grande quantidade de moléculas de colágeno (Figura 10 E e F).

Com a utilização de diferentes técnicas de coloração, como ATO, CBB, PAS e a Técnica Tricrômico de Mallory, não só foi possível identificar os diferentes tipos de moléculas presentes no estroma, bem como, a distribuição destas moléculas nas diferentes regiões das vilosidades coriônicas e da decídua basal no tecido da placenta humana.

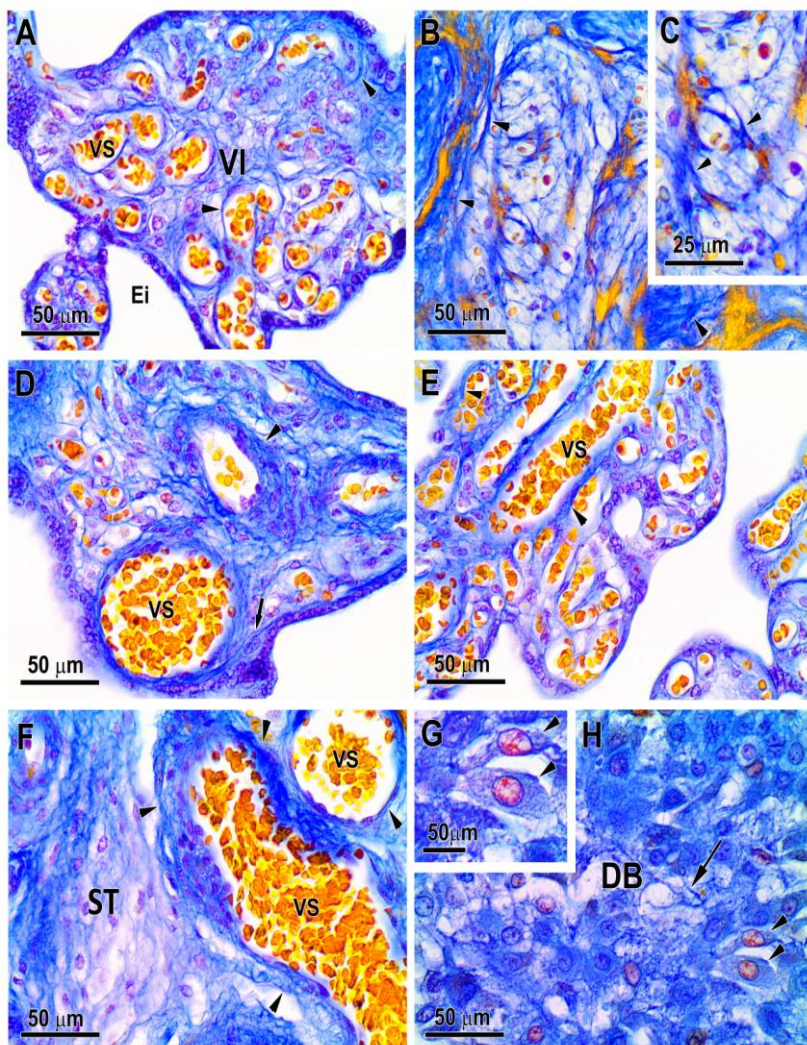


Figura 10. Seções histológicas de vilosidades coriônicas e da decídua basal da placenta humana a termo. A, B, C, D, E e F: colágeno (cabeça de seta); A, B, C, D, E, F: vilosidade coriônica (VI) com vários vasos sanguíneos (VS), de diferentes formas e calibres; G e H: decídua basal (DB), célula decidual (seta) e fibras de colágeno (cabeça de seta). Contra-coradas: Hematoxilina.

4.2 Técnica de Imunohistoquímica

Buscamos por meio da técnica de Imunohistoquímica (IHQ) empregada no tecido da placenta humana, avaliar a expressão dos marcadores: CD73, CD105 e CD34 nas membranas das células presentes neste tecido, em como, o perfil de expressão do colágeno do tipo I, fibronectina e laminina na matriz extracelular (MEC).

4.2.1 Expressão do colágeno tipo I

Através da técnica de IHQ, buscamos avaliar qual é o perfil de expressão do colágeno do tipo I (Col I), na matriz extracelular do tecido da placenta.

A aplicação desta técnica foi realizada, nas regiões das vilosidades coriônicas e na decídua basal do tecido. Os resultados obtidos nos mostram que a expressão do colágeno do tipo I ocorreu tanto no estroma das vilosidades coriônicas, bem como, na região da decídua basal (Figura 11). Essa expressão do colágeno do tipo I ocorreu em todas as áreas das vilosidades coriônicas, com exceção do sinciciotrofoblasto, onde não houve como mostra a Figura 11 (B, C, D e E).

A expressão do colágeno do tipo I ocorreu também nas regiões da decídua basal (Figura 11 G). Não houve expressão nas amostras do tecido da placenta que foram utilizadas como controle, confirmando, que moléculas de colágeno do tipo I estão presentes no tecido de placenta humana, tanto no estroma das vilosidades coriônicas como, também, nas regiões da decídua basal.

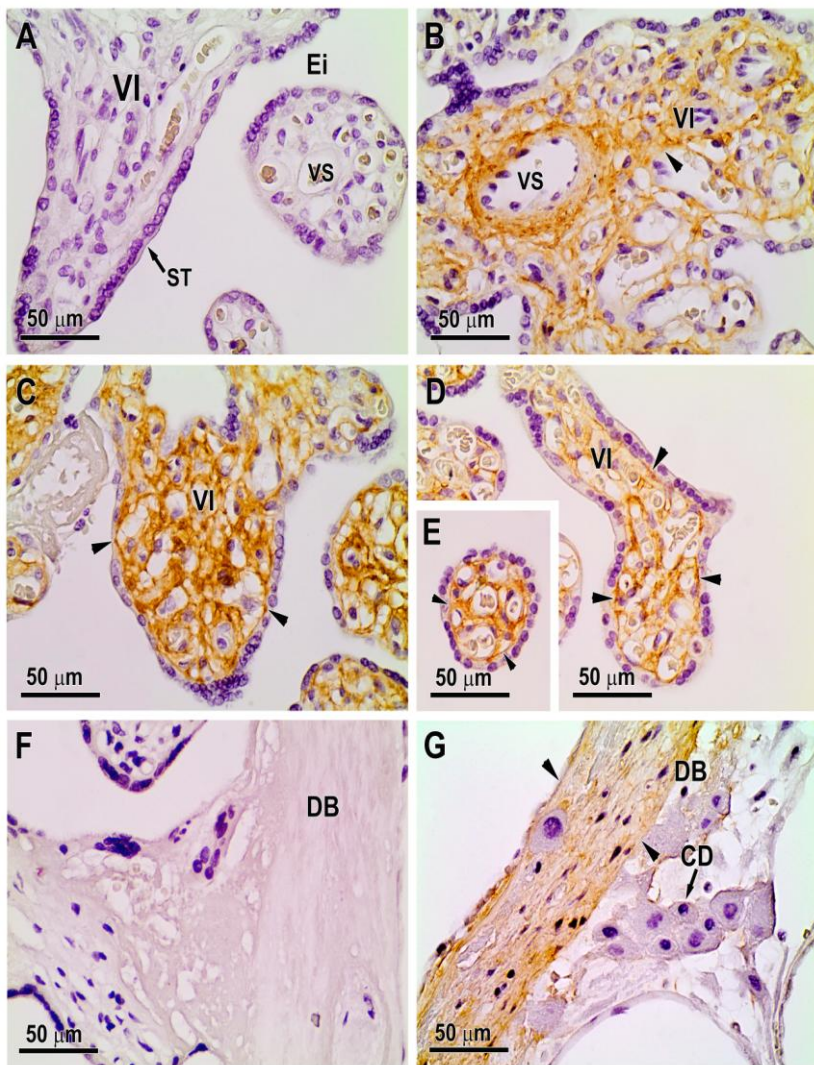


Figura 11. Seções histológicas de vilosidades coriônicas e da decídua basal da placenta humana a termo evidenciando a expressão do colágeno tipo I. A: controle negativo (sem utilização do anticorpo primário); Vvlosidade coriônica (VI), sinciotrofoblasto (seta), vaso sanguíneo (VS) e espaço intervilloso (EI); **B, C, D e E:** marcação do colágeno tipo I nas vilosidades coriônicas (cabeça de seta); **F:** controle: decídua basal (DB), **G:** expressão do marcador de colágeno tipo I na decídua basal (cabeça de setas) e células decíduais (CDe). Contra-coradas com Hematoxilina.

4.2.2 Expressão de fibronectina

Os resultados obtidos nos mostram que nas vilosidades coriônicas do tecido da placenta, a expressão da proteína de matriz extracelular, a fibronectina foi positiva, quando comparada com o controle, onde os resultados se mostraram negativos (Figura 12 A).

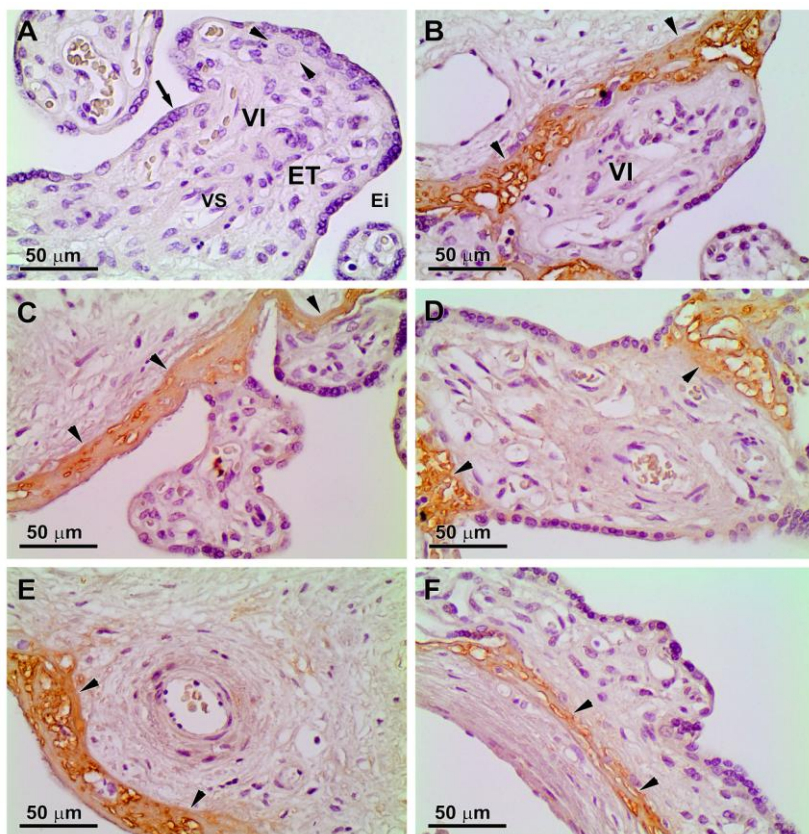


Figura 12. Seções histológicas de vilosidades coriônicas da placenta humana a termo evidenciando a expressão de fibronectina, nas vilosidades coriônicas da placenta humana. **A:** controle negativo (sem utilização do anticorpo primário): vilosidade coriônica (VI), sinciciotrofoblasto (seta), vaso sanguíneo (VS) e espaço intervilloso (Ei), estroma (ET), célula citotrofoblastica (cabeça de seta) e sinciciotrofoblasto (seta); **B, C, D, E e F:** marcação da fibronectina nas vilosidades coriônicas (cabeça de seta). Contra-coradas: Hematoxilina.

A presença de moléculas de fibronectina, indicadas pelas cabeças de setas nas regiões das vilosidades (Figura 12 B, C, D, E e F) nos mostra que moléculas de fibronectina não só estão presentes nas vilosidades coriônicas do tecido da placenta, bem como estas moléculas ocupam áreas onde a laminina, também está presente. (Figura 13 B-H). Com isso, podemos inferir que moléculas de fibronectina e de laminina estão presentes em áreas comuns das vilosidades coriônicas fetais no tecido da placenta. A fibronectina é uma molécula que está presente na matriz-extracelular de diferentes tecidos. Esta molécula induz a migração de células progenitoras mesenquimais em cartilagem após a microfratura (KULAWIGA *et al.*, 2013).

4.2.3 Expressão de laminina

Através da técnica de IHQ, buscou-se avaliar o perfil de expressão da laminina (LN) no tecido da placenta. Os resultados obtidos nos mostram que moléculas de laminina estão presentes na membrana basal trofoblástica, membrana esta que separa o sinciotrofoblasto e o citotrofoblasto do estroma das vilosidades coriônicas. A expressão de moléculas de laminina foi positiva nas regiões das vilosidades coriônicas do tecido da placenta. A laminina (LN) é uma molécula que está presente na MEC em vários tipos de tecidos. É um componente importante da membrana basal trofoblástica. (Figura 13 B, C, D, E, F, G e H).

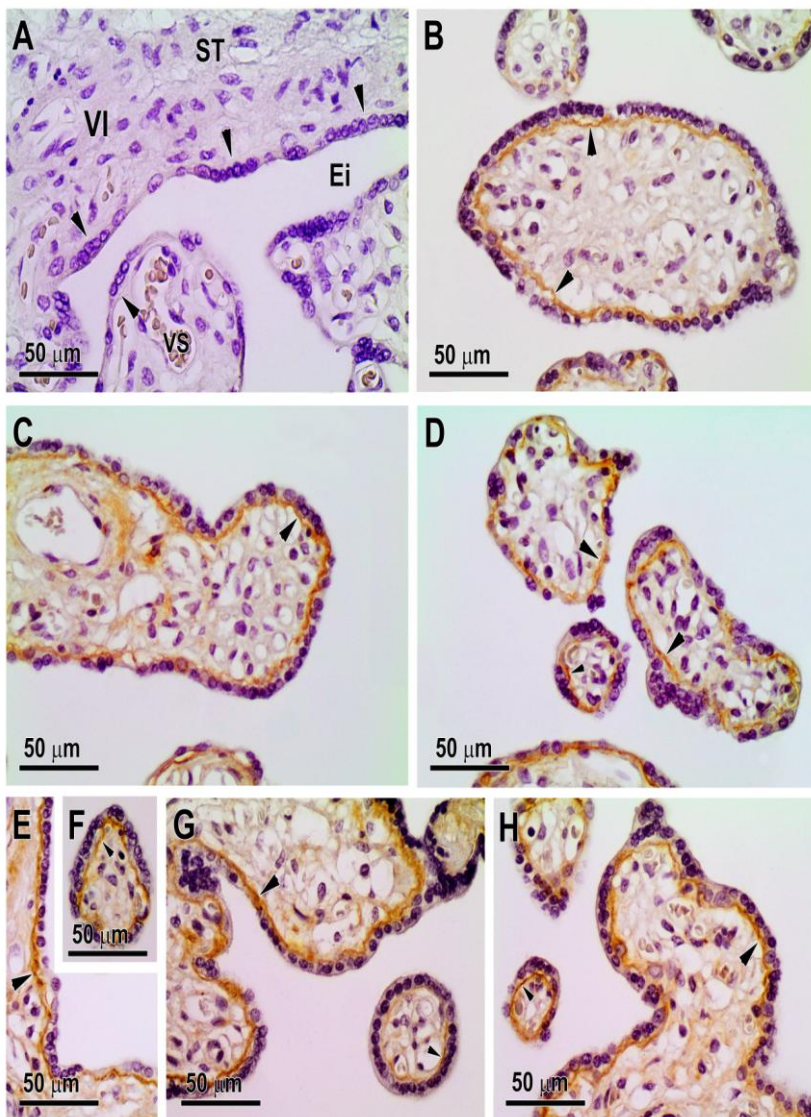


Figura 13. Seções histológicas de vilosidades coriônicas da placenta humana a termo evidenciando a expressão de laminina nas vilosidades coriônicas da placenta humana. **A:** Controle negativo. Vilosidade coriônica (VI), vaso sanguíneo (VS) e espaço intervilloso (Ei), estroma (ET) e região da laminina (cabeça de seta); **B, C, D, E, F, G e H:** marcação da laminina nas vilosidades coriônicas (cabeça de seta). Contra-coradas: Hematoxilina.

4.2.4 Expressão do marcador CD73

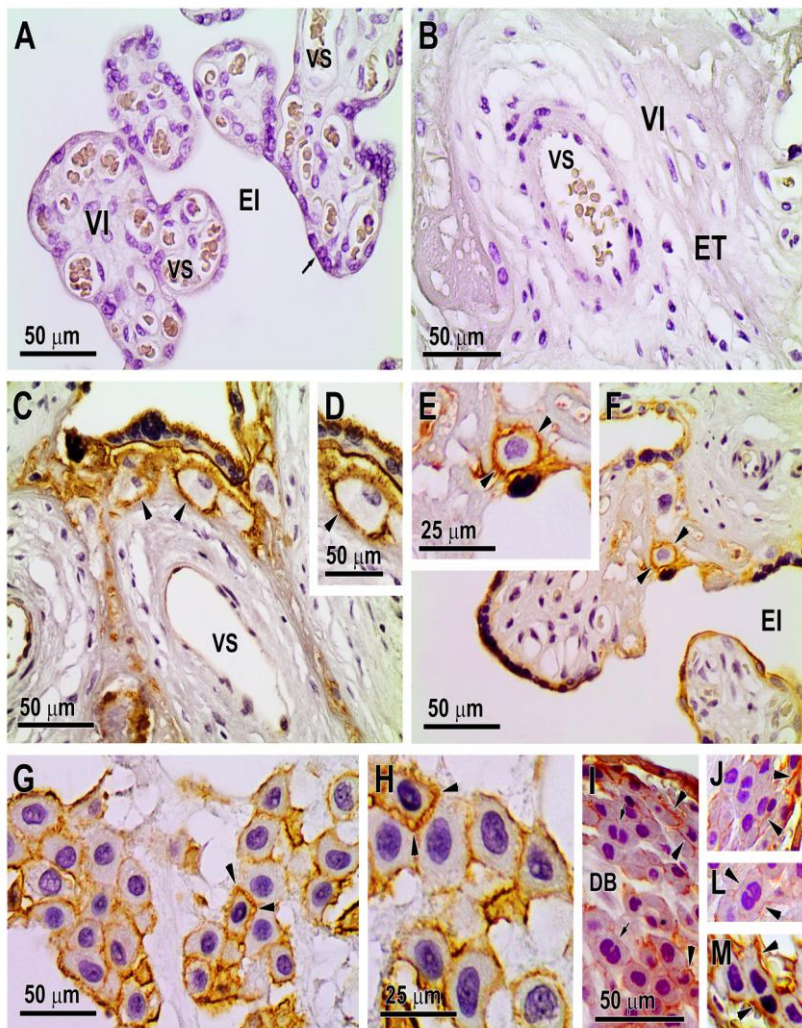


Figura 14. Seções histológicas de vilosidades coriônicas e da decídua basal da placenta humana a termo evidenciando a expressão do marcador de superfície CD73. **A, B:** controles negativos: vilosidades coriônicas (VI), vasos sanguíneos (VS), sinciotrofoblasto (seta), espaço intervilloso (EI) e estroma (ET); **D e E** (inserto), **C, F, G, H:** marcação de superfície do CD73 na vilosidade coriônica; **I, J, L e M:** expressão do marcador CD73 na decídua basal (cabeça de seta) e células em mitose (seta). Contra-coradas: Hematoxilina.

Os resultados apresentados para o marcador CD73 mostraram que células presentes nas regiões das vilosidades coriônicas, como na decídua basal do tecido da placenta humana, expressaram o marcador CD73⁺. Como pode se observar células que expressaram o marcador CD73⁺ estão localizadas nas várias regiões das vilosidades coriônicas (Figura 14 C, D, E, F, G e H). Observou-se também, na região da DB, a presença de figuras mitóticas em plena atividade, mostrando que o tecido da placenta a termo ainda apresenta atividades, indicando que estas células demonstram plena atividade metabólica (Figura 14 I, J, L e M).

4.2.5 Expressão do marcador CD105

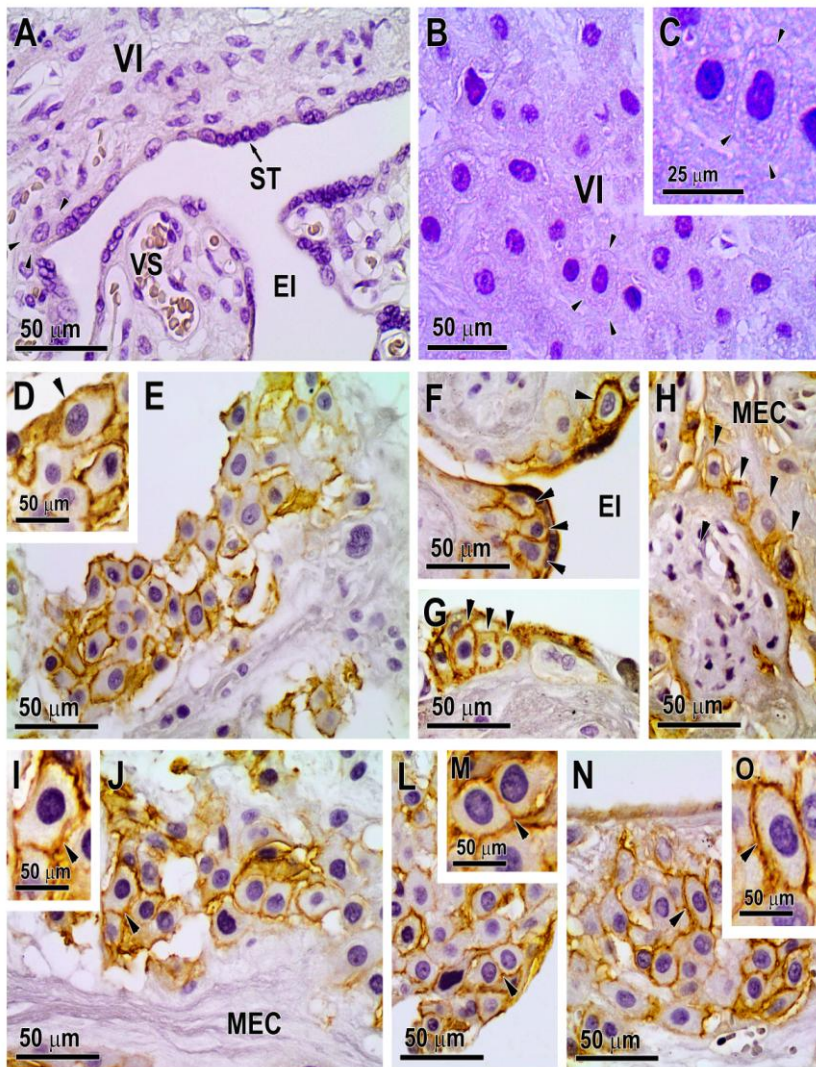


Figura 15. Seções histológicas de vilosidades coriônicas da placenta humana a termo evidenciando a expressão do marcador de superfície CD105. A, B e C (inserto): controles negativos: sinciciotrofoblasto (ST), espaço intervilloso (EI). A: célula citotrofoblástica (cabeça de seta); C (inserto); E, F, G, H, J, L, N: expressão do marcador CD105 e MEC; D, I, M e O (inserto): células marcadas com CD105. Contra-coradas: Hematoxilina.

Como pode se observar a expressão desse marcador ocorreu nas células das vilosidades coriônicas do tecido da placenta humana. Os resultados apresentados para o marcador CD105 mostraram que células presentes nestas regiões do tecido da placenta expressaram este tipo de marcador de superfície de membrana, que é característico de CTMs (Figura 15).

4.2.6 Expressão do marcador CD34

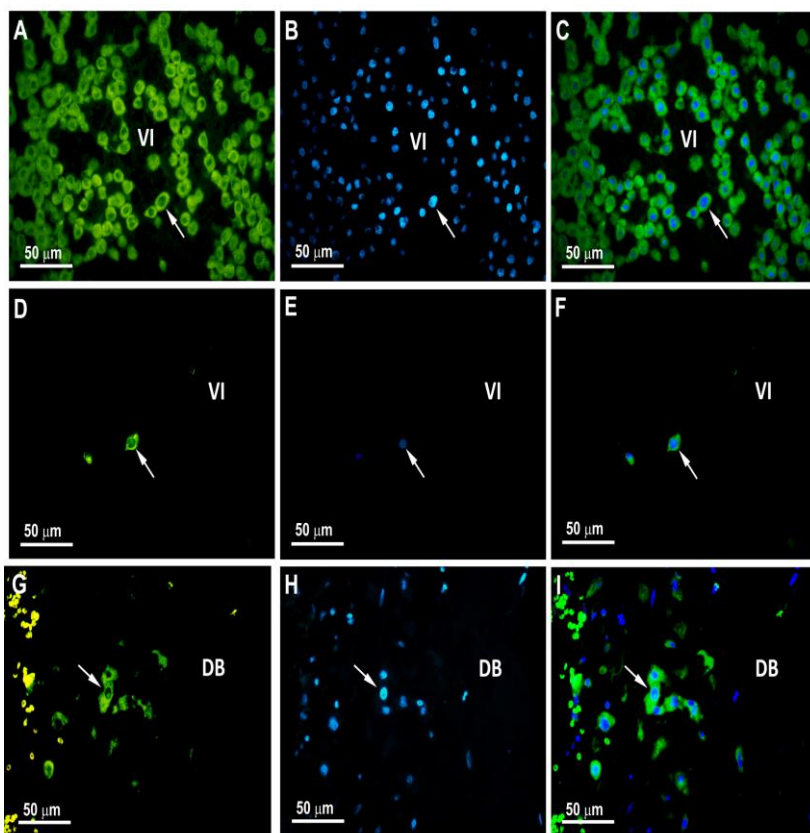


Figura 16. Seções histológicas de vilosidades coriônicas e da decídua basal da placenta humana a termo evidenciando a expressão do marcador de superfície CD34. **A, D:** marcador de CD34 nas vilosidades coriônicas (VI); **B, E:** DAPI e **C, F:** sobreposição das imagens; **G:** marcador de CD34 na decídua basal (DB), **H:** DAPI e **I:** sobreposição das imagens. Contra-coradas: DAPI.

Os resultados mostraram também que nas vilosidades coriônicas o número de células que expressaram o marcador $CD34^+$ foi maior do que na região da decidua basal (Figura 16 A). A expressão deste tipo de marcador apresentado por estas células, nas duas regiões do tecido da placenta, remete para células com características imunofenotípicas de células-tronco hematopoéticas (CTHs). Portanto, o tecido da placenta humana, parece possuir estoques de células que expressam este tipo de marcador de membrana. Este marcador é característico de CTHs. Estes resultados mostram que as CTMs têm uma disposição na região das vilosidades coriônicas, juntamente em associação com moléculas de laminina e de colágeno. A fibronectina é expressa nas vilosidades coriônicas em associação à lâmina basal e na região perovascular. No sinciciotrofoblasto, as CTMs se associam próximas às $CD34^+$ com característica de CTHs. As análises ultraestruturais efetuadas pela MET demonstram plena atividade metabólica e de células que organizam a placenta, tanto bioquimicamente quanto metabolicamente, sugerindo que a placenta, mesmo a termo, é ainda capaz de produções celulares, tanto de CTs quanto na homeostase do tecido. As interações entre as células e a MEC são cruciais para determinar os padrões de comportamento celular, tais como crescimento, morte, diferenciação e motilidade que, por sua vez, apresentam importância em diversos mecanismos, como morfogênese, inflamação, resposta imune, invasão parasitária, transformação celular e metástase (CHAMMAS *et al.*, 1991).

4.3 Análise de microscopia eletrônica de transmissão

Na figura 17 A observa-se através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) a presença do sinciciotrofoblasto, um epitélio que separa o interior das vilosidades coriônicas do sangue materno, que flui em torno das vilosidades. Na superfície do sinciciotrofoblasto há presença de um grande número de microvilos que estão em contato direto com o sangue materno, os espaços existentes entre as vilosidades coriônicas.

Também é possível observar a presença de um grande número de vesículas de várias formas e tamanhos, distribuídas em praticamente toda a extensão desse epitélio. Neste tecido, também encontramos organelas como: o retículo endoplasmático rugoso (RER) que possui um papel fundamental na síntese de proteínas e enzimas para as células do tecido (Figura 17 B e C) e o complexo de Golgi (Figura 17 D), este possui um papel também muito importante nas alterações pós-

traducionais. Estas mudanças ocorrem com uma série de proteínas e enzimas que são sintetizadas no RER e, como exemplo, tem-se as enzimas lisossomais, as glicoproteínas que vão repor proteínas da camada externa da membrana celular de diferentes tipos celulares. As mitocôndrias, que também estão presentes nestes tecidos e se mostram estruturalmente íntegras, mostrando que esta organela possui condições plenas para desempenhar as suas funções como a respiração celular e a produção de energia.

Esta energia na forma de ATP é utilizada pelas células e tecidos, na maior parte de suas atividades (Figura 17 E e F). A presença do retículo endoplasmático rugoso (RER) potencialmente ativo, o complexo de Golgi bem desenvolvido e de grandes mitocôndrias nestas células, indica uma capacidade para atividade endócrina destas células (Figura 17 B, C, D, E e F). Também, os nucléolos que estão presentes nos núcleos das células do tecido da placenta, pode ser um indicativo da síntese que este órgão apresenta (Figura 17 G e H). Isto é um indicativo que a placenta humana a termo é amplamente funcional, com todas as condições de possuir uma estrutura de suporte para diferentes células-tronco.

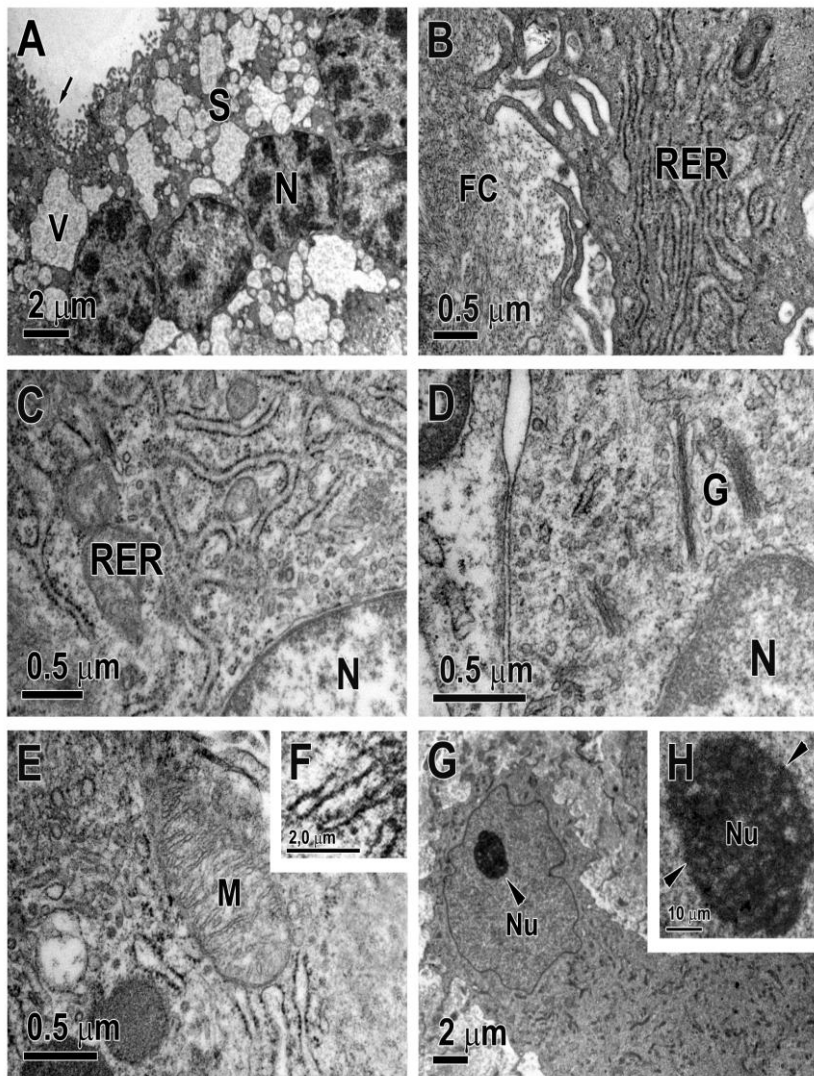


Figura 17. Vilosidades coriônicas da placenta humana a termo, analisadas em microscópio eletrônico de transmissão. A: sinciotrofoblasto (S), vesículas com diferentes formas e tamanhos (V), a presença de microvilos (seta) e núcleo (N); **B:** retículo endoplasmático rugoso (RER) e filamentos na MEC (FC); **C:** retículo endoplasmático rugoso (RER), núcleo (N); **D:** complexo de Golgi (G), núcleo (N); **E:** mitocôndria (M); **F:** cristas mitocondriais (inserto); **G e H:** presença de nucléolos (Nu).

Células do tecido da placenta humana apresentam uma série de características estruturais que confere a estas células uma atividade funcional. Atividades como o processo de endocitose de vesículas e partículas através da membrana citoplasmática (Figura 18 A, B, D e E). Pode se observar, também no citoplasma destas células, a presença de mitocôndrias (Figura 18 E e M), depósitos de glicogênio, em várias regiões do citoplasma das células deste tecido (Figura 18 B e E). Nas vilosidades coriônicas, observa-se também a presença de um grande número de filamentos (Figura 18 F, G, H, I, J, L, M e N) na MEC nas várias regiões do tecido.

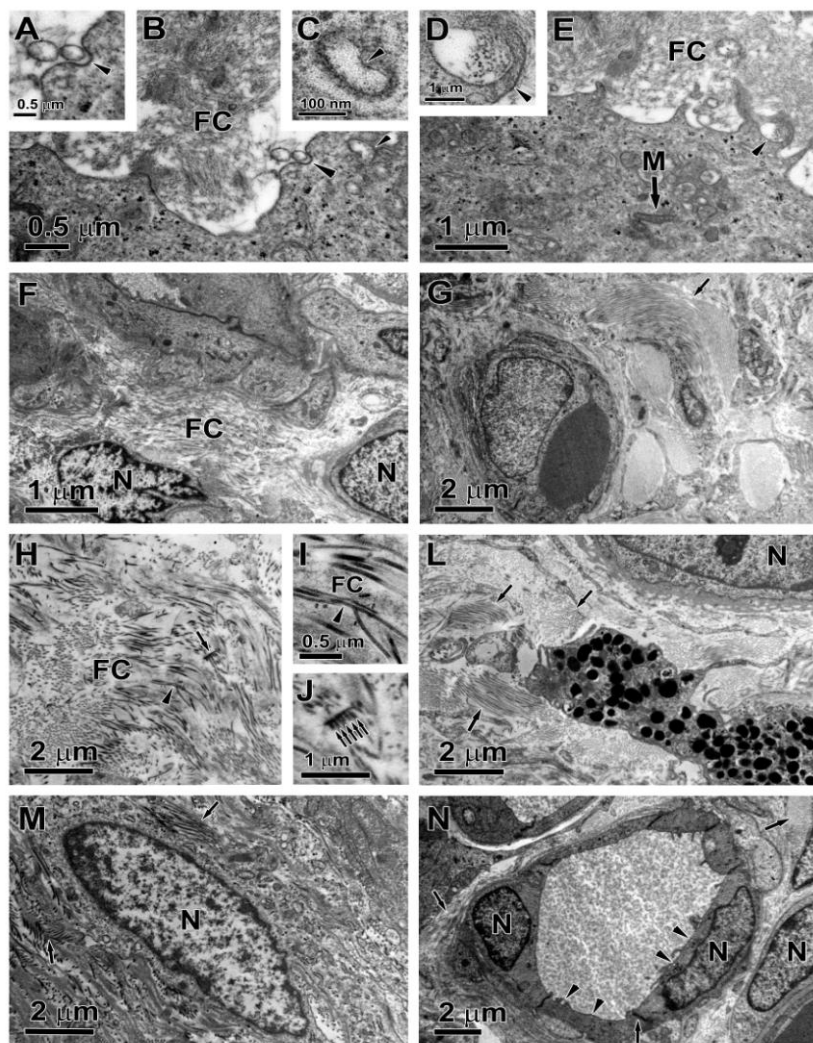


Figura 18. Vilosidades coriônicas da placenta humana a termo, analisadas em MET. A, B, C, D e E: processo de endocitose (cabeça de seta), a presença de vesículas endocíticas e filamentos na MEC; **A, C e D** (inserto); **F, G, H, L, M e N:** presença de filamentos na MEC entre células do tecido; **G:** vaso sanguíneo (VS) envolto por filamentos na MEC; **I e J** (inserto), **L e M:** presença de filamentos na MEC; **N:** presença de um vaso sanguíneo (VS) com endotélio, apresentando o processo de endocitose (cabeça de seta), núcleos (N) e filamentos na MEC.

Em resumo, observou-se que as CTMs do tecido da placenta humana têm uma disposição na região das vilosidades coriônicas, juntamente em associação com moléculas de laminina e de colágeno. A fibronectina, outro componente da MEC, também está presente nas vilosidades coriônicas em associação à lâmina basal e perivascularmente (Figura 12). No sinciotrofoblasto, as CTMs se associam próximas às $CD34^+$ com característica de CTHs.

As análises ultraestruturais demonstram que o tecido da placenta apresenta atividade metabólica plena, tanto bioquimicamente quanto metabolicamente, sugerindo que a placenta, mesmo a termo, é ainda capaz de manter a síntese e a capacidade secretória, bem como as produções celulares, tanto de CTs quanto na homeostase do tecido.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo fazer uma avaliação do nicho molecular das células-tronco no tecido da placenta humana. Nesta investigação foram utilizadas técnicas para caracterizar histológica, histoquímica, imuno-histoquimicamente e ultraestruturalmente (MET), o tecido da placenta humana. Por meio destas análises, procurou-se verificar a arquitetura e a distribuição de moléculas da matriz extracelular (MEC) bem como, a distribuição de células-tronco hematopoéticas (CTHs) e de células-tronco mesenquimais (CTMs) nas diferentes regiões do tecido da placenta, isto é, nas vilosidades coriônicas e na decídua basal. Com isso, foi possível, avaliar a estrutura, a ultraestrutura e a composição molecular, para a caracterização dos nichos celulares e moleculares do tecido.

A placenta humana é um órgão altamente especializado responsável por realizar o intercâmbio de substâncias entre o sangue materno e o fetal (SCHNITZER *et al.*, 1995; PREDESCU *et al.*, 1997). A placenta apresenta uma estrutura complexa especializada e responsável pela troca de moléculas, íons e gases entre a circulação materna e fetal (TIMOTHY *et al.*, 2002). É um órgão materno-fetal que representa uma significativa, valiosa e promissora fonte de células-tronco. Origina-se do trofoectoderma, que conduz para o componente do trofoblasto, incluindo o sinciciotrofoblasto e o citotrofoblasto. As populações de células-tronco derivadas de tecidos da placenta humana são as células estromais mesenquimais coriônica e as células trofoblásticas corial, ambas demonstrando plasticidade variável (HEMBERGER *et al.*, 2008; PAROLINI *et al.*, 2008).

As CTMs representam atualmente uma fonte potencial de células para utilização na área de terapia celular devido à sua capacidade de auto-renovação e diferenciação em células especializadas do organismo (DAN *et al.*, 2008). O epitélio amniótico (MIKI *et al.*, 2005), o tecido adiposo (ZUK *et al.*, 2001) e a polpa dentária (GRONTHOS *et al.*, 2002) são fontes acessíveis de CTMs. Estas células-tronco estão distribuídas numa grande variedade de tecidos do corpo humano, como na medula óssea, rim e fígado. Estas células estão também presentes no feto (fígado, medula óssea, fígado, rim. Resultados obtidos por (ZONGNING *et al.*, 2006) mostra que CTMs, também estão presentes na placenta humana a termo. A placenta como órgão fetomaterna é também uma fonte potencial de células-troncos (HAYATI *et al.*, 2011).

A placenta humana tem sido usada extensivamente como uma fonte de componentes de MEC (CHUNG *et al.*, 1976; FURUTO & MILLER, 1980; ISEMURA *et al.*, 1984). A matriz é um complexo estável constituído de macromoléculas circundando células do estroma (HAY, 1981). Embora inicialmente considerado um suporte inerte a MEC desempenha uma série de funções como nas interações célula-matriz e entre matriz-matriz, na diferenciação e no desenvolvimento de células e tecidos (HAY, 1981).

Para elucidar a distribuição e a interrelação dos seus componentes moleculares, foram utilizados neste trabalho, marcadores para fazer uma avaliação da presença de moléculas de colágenos do tipo I, da fibronectina, da laminina, colágenos no geral, de proteínas totais, de polissacarídeos ácidos e de polissacarídeos neutros. Apesar do extensivo uso em estudos bioquímicos, pouco se sabe a respeito dos componentes da MEC e sua distribuição no tecido da placenta humana.

As primeiras investigações realizadas neste trabalho com o tecido da placenta foram iniciadas com a aplicação de uma técnica histológica de rotina, a coloração com Hematoxilina e Eosina (BEÇAK & PAULETE, 1976). Aqui foi possível a identificação dos elementos teciduais da placenta humana, proporcionando assim, um diagnóstico mais morfológico e estrutural do tecido (Figura 4 e 5). Por meio destas técnicas de coloração, não só foi possível identificar a presença das estruturas do tecido da placenta, como as vilosidades coriônicas e a decídua basal, bem como auxiliou na avaliação das condições do tecido, após a aplicação da técnica de preparo do material, para realizar os cortes histológicos.

Outra característica que pode ser destacada é com relação ao número e a quantidade de diferentes tipos celulares que compõem as vilosidades coriônicas do tecido placentário. Como exemplos, tem-se o sinciciotrofoblasto, que consiste de uma camada epitelial que separa o interior das vilosidades do sangue materno. O sinciciotrofoblasto não é composto de células individualizadas, mas representa uma camada superficial multinucleada das vilosidades coriônicas. Outro exemplo, o citotrofoblasto, consiste de células individuais ou agregadas, as chamadas células de Langhans', que são as células-tronco do sinciciotrofoblasto, que mantêm o crescimento e a regeneração desta última (Figura 4). Além das vilosidades coriônicas do tecido placentário, pode-se também observar a decídua basal (Figura 5). A decídua refere-se à camada funcional do endométrio de uma mulher grávida (endométrio gravídico). Nesta região, foi possível observar a presença de um grande número de células que extrapolam os limites das

vilosidades coriônicas da placenta e invade a decídua basal neste tecido, as chamadas células citotrofoblásticas extravilosas. A maior parte das células desta região apresenta uma uniformidade nas formas e em algumas dessas células, o núcleo não é visível (Figura 5: E e F).

As secções do tecido, também foram coradas com a solução de Azul Brilhante de Coomassie (CBB), esta técnica de coloração aqui utilizada, foi para identificar e localizar a presença de proteínas totais. Podemos observar que a distribuição das proteínas totais se mostraram presentes em todas as regiões do tecido, com destaque para as regiões do sinciciotrofoblasto e na parede dos vasos sanguíneos das vilosidades coriônicas. Na decídua basal, em algumas regiões há uma maior concentração como mostrado na (Figura 6).

Foram também, identificadas no tecido da placenta à presença de outros tipos de moléculas, como polissacarídeos ácidos, através do corante azul de toluidina (ATO) (Figura 7), polissacarídeos neutros, através da técnica do ácido periódico de Schiff (PAS) (Figuras 8 e 9) e moléculas de colágenos, utilizando a técnica Tricômico de Mallory (Figura 10). Com a técnica de imuno-histoquímica foi possível avaliar, o perfil de expressão de moléculas da matriz extracelular (MEC), como o colágeno do tipo I (Figura 11), a fibronectina (Figura 12), e a laminina (Figura 13).

As expressões dos marcadores de moléculas como a fibronectina, a laminina e algumas isoformas de colágeno, também ocorreram ao longo das vias de migração das células da crista neural e foi sugerido que estas moléculas possuem uma participação na migração de células da crista neural (STERNBERG & KIMBER, 1986; TUCKETT & MORRIS-KAY, 1986; PERRIS, 1997). Estudos *in vitro* confirmaram estudos realizados *in vivo*, mostrando que, moléculas de fibronectina, colágenos e laminina, auxiliam na difusão e na migração de células da crista neural (GREENBERG *et al.*, 1981; PERRIS *et al.*, 1989, 1996a).

A migração celular desempenha um papel importante em numerosos processos fisiológicos e patofisiológicos, por exemplo, na embriogênese, na cicatrização de feridas, na angiogênese ou no crescimento das células-tronco (BALKWILL, 1998; LUSTER, 1998; VOROTNIKOV, 2011). A capacidade das células de migrar pode ser utilizada na medicina regenerativa. A medicina regenerativa é um campo da ciência com o objetivo de restaurar o tecido humano, por exemplo, através da utilização de células-tronco e células progenitoras (MIMEAULT *et al.*, 2007; SNG & LUFKIN, 2012) e novas abordagens clínicas como, enfarto do miocárdio (ZHANG *et al.*, 2010) e

cicatrização de feridas (BROWER *et al.*, 2011). Podemos sugerir que as moléculas que foram identificadas na MEC do tecido da placenta humana, neste trabalho, também podem estar relacionadas, com a função de auxiliar na difusão e na migração de células-tronco no tecido da placenta.

A fibronectina é uma molécula que está presente na matriz-extracelular de diferentes tecidos. Esta molécula induz a migração de células progenitoras mesenquimais. Isso pressupõe que a fibronectina pode estar envolvida na migração de células progenitoras mesenquimais em cartilagem após a microfratura. Por isso, podem ser útil em aplicações clínicas para estimular a migração de células progenitoras mesenquimais em cartilagem após a microfratura (KULAWIGA *et al.*, 2013). Moléculas de matriz extracelular como os colágenos tipos I e III, laminina, vimentina e osteonectina participam no processo de diferenciação das CTM (HU *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003; KLEES *et al.*, 2005).

Marcadores de superfície celular, denominados “Cluster” de Diferenciação (CD), foram utilizados para avaliar qualitativamente o perfil das células presentes neste tecido, como as CTMs e CTHs. Foram também, avaliadas a expressão de marcadores de moléculas da MEC nas duas regiões do tecido da placenta, isto é, nas vilosidades coriônicas e na decídua basal. Os resultados do perfil de expressão dos marcadores de superfície de membrana CD73⁺ (ecto-5'-nucleotidase), CD105⁺ (endogлина) e CD34⁺, e a expressão de moléculas da MEC como o colágeno do tipo I, a fibronectina e a laminina, se mostraram positivos (Figuras 14, 15 e 16) e (Figuras 11, 12 e 13), respectivamente.

Portanto, através da técnica de IHQ, foi possível, identificar tanto a presença desses marcadores (CDs) nas membranas das CTMs e CTHs, bem como, de moléculas na MEC, nas duas regiões do tecido da placenta, isto é, nas vilosidades coriônicas e na decídua basal. Células no tecido da placenta humana expressaram marcadores de superfície celular como os CD73⁺, CD105⁺ e CD34⁺. Estas proteínas são encontradas na membrana celular das células-tronco mesenquimais e células-tronco hematopoéticas, respectivamente. Moléculas como colágeno do tipo I, fibronectina, laminina, colágenos no geral, proteínas totais, polissacarídeos ácidos e polissacarídeos neutros, também foram identificadas no tecido.

O Colágeno do tipo I é a unidade estrutural básica da placenta humana a termo, são constituídos de feixes de fibras com um diâmetro de 30 – 35 nm. Está associado aos colágenos dos tipos III, V, VI e a fibronectina (AMENTA *et al.*, 1986). Esta molécula, localizada no

interstício de cada vilosidade coriônica, apresenta um padrão de distribuição. Nestes estudos observou-se que a distribuição de Colágeno tipo I tem uma disposição na região das vilosidades coriônicas, em associação com moléculas de laminina. Nestas mesmas regiões foram identificadas células que expressaram marcadores de superfície de membrana como CD73⁺, CD105⁺ e CD34⁺.

Este conjunto, constituído de células e de moléculas presentes no tecido da placenta, nos leva a sugerir que esta organização pode configurar um nicho celular importante, que pode proporcionar uma série interações entre os componentes moleculares e celulares. Esta interação pode propiciar um microambiente favorável, que leva as células-tronco a se manter neste estado ou conduzi-las ao processo de diferenciação, tanto de CTMs como de CTHs.

O colágeno tipo I é o substrato mais abundante no corpo. A interação de CTMs com matriz de colágeno tipo I ocorre por meio de integrinas $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 2\beta 1$, resultando na via transdução de sinal que conduz à ativação da ERK. A contribuição específica de $\alpha 2\beta 1$ na ativação de ERK consiste em desencadear a ativação de PP2A. Neste processo, a ativação de Ras, Raf-1 e PP2A é necessária para a proteção celular da apoptose mediada por Fas. Enquanto o colágeno tipo I ativa Ras, a fibronectina não consegue ativar PP2A e Raf-1 (CHETOUI *et al.*, 2006).

Parece que na placenta a organização de colágeno tipo I tem uma importância fundamental na sobrevivência celular, possivelmente, atuando também na manutenção do fenótipo indiferenciado. Foi demonstrado que a interação de células-tronco com colágeno tipo I mantém as células-tronco em um estado indiferenciado e com auto-renovação através da interação da integrina $\alpha 2\beta 1$ (SUH & HAN, 2011).

A fibronectina está comumente associada com moléculas de colágenos e sintetizada por uma ampla variedade de tipos celulares, que também se organizam em fibras na MEC (YAMADA, 1991). A fibronectina está presente no plasma materno e fetal e foi observado que esta molécula reveste as superfícies de células do endotélio e do trofoblasto em contato com o plasma. A fibronectina também está presente no plasma materno e fetal e ao longo do estroma das vilosidades coriônicas, como filamentos livres e revestindo fibras de colágenos. A membrana basal (MB) contém laminina e colágeno tipo IV e fibronectina (AMENTA *et al.*, 1986).

Foi observado, que a fibronectina e colágeno do tipo I, se expressam nas vilosidades coriônicas sempre em associação à lâmina basal e perivascularmente. Tem sido descrito que fibronectina associada

a outras moléculas de MEC como colágenos ou laminina é um forte sinal para induzir a diferenciação de CTMs. Possivelmente, essa organização perivascular da fibronectina pode sugerir a capacidade de “gradientes de diferenciação”, à medida que a CTM transita pelas diferentes estruturas do tecido (CHATAKUN *et al.*, 2014).

Observou-se a expressão de laminina nas regiões entre o sinciotrofoblasto e o estroma das vilosidades coriônicas, onde encontramos a presença da membrana basal e no endotélio. A laminina é o maior componente da membrana basal, é formada de várias subunidades (YAMADA, 1991) e está associada ao Colágeno tipo IV. A função exata da laminina na placenta é desconhecida, mas postula-se que ela pode ter um papel de adesão, migração e diferenciação das células trofoblásticas migratórias no início da gravidez.

A MEC possui uma série de componentes moleculares como os colágenos, a fibronectina, a vitronectina, o fibrinogênio e a laminina, que são proteínas importantes e são reconhecidas por receptores de adesão (VAN DER FLIER & SONNENBERG, 2001). Componentes não proteicos, também constituem a MEC, que são os glicosaminoglicanos, tais, como o condroitin sulfato, o heparan sulfato e a queratina sulfato (IOZZO, 1998; HEINO & KAPYLA, 2009).

Em outros tecidos as moléculas de fibronectina, laminina e algumas isoformas de colágenos, também se expressam ao longo das vias de migração de células da crista neural e são sugeridos para ser permissivo para migração de células da crista neural (STERNBERG & KIMBER, 1986; TUCKETT & MORRIS-KAY, 1986; PERRIS, 1997). Células-tronco neurais (CTNs) estão em associação com projeções da membrana basal vascular, composta principalmente da laminina, colágeno IV, e proteoglicanos (KEREVER *et al.*, 2007). Moléculas de MEC modulam a diferenciação e a manutenção de CTNs e influenciam a migração dos seus descendentes (BARROS *et al.*, 2011). Um exemplo está representado pelos proteoglicanos heparan sulfato e o condroitin sulfato, que regulam a proliferação e a diferenciação de CTNs, principalmente pelos fatores de crescimento que apresentam, como EGF e FGF, para receptores CTNs (SIRKO *et al.*, 2007), (AKITA *et al.*, 2008).

Os proteoglicanos contendo heparan sulfato (HSPGs) desempenham papéis importantes nos processos biológicos, como no crescimento e no desenvolvimento de células (BERNFELD & PERRIMON, 2000), na angiogênese (SASISEKHARAN *et al.*, 1997) e como um anticoagulante (PETITOU *et al.*, 1999). Como funções do Heparan sulfato ele atua como um co-fator na adesão celular, na

motilidade, na proliferação, na diferenciação e na morfogênese do tecido através da interação com diversos ligantes de proteína, através de sequências específicas de sacarídeos (ROSENBERG *et al.*, 1997; BERNFIELD *et al.*, 2007).

Utilizando critérios estabelecidos pelo Comitê de Células Tronco Tecidual e Mesenquimal da Sociedade Internacional para Terapia Celular (DOMINICI *et al.*, 2006), foi identificado neste estudo que, nas células das vilosidades coriônicas do tecido da placenta humana, houve a expressão de marcadores de superfície de membrana, normalmente presentes em CTMs. A interação de CTMs com os elementos da MEC como laminina, colágeno tipo I e proteoglicanos devem regular as propriedades do nicho, como a auto-renovação e a manutenção do fenótipo indiferenciado (Figuras 19 e 20). Provavelmente, essa combinação de elementos organiza um nicho, que favorece para as CTMs a capacidade de promover a diferenciação para diferentes fenótipos (MARTINI *et al.*, 2013).

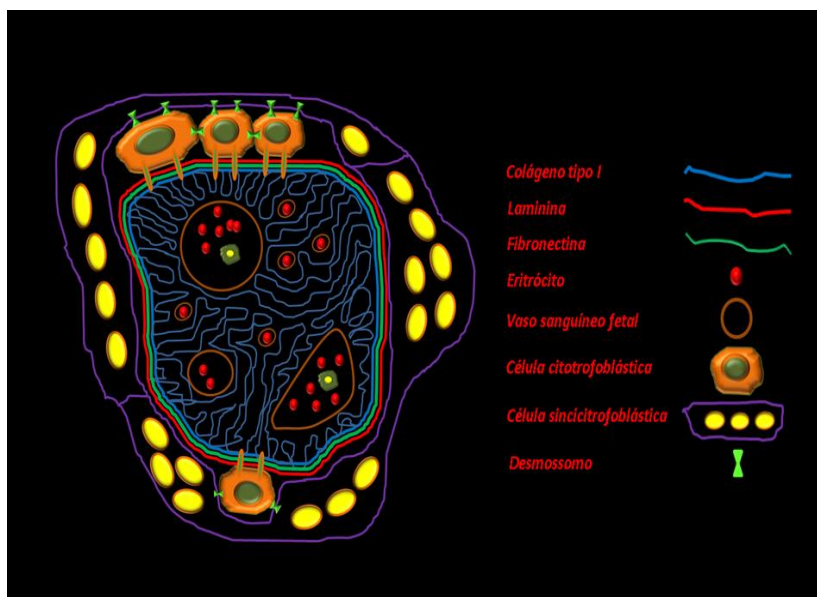


FIGURA 19. Representação esquemática de uma vilosidade coriônica do tecido da placenta humana. Diferentes tipos de proteínas da MEC estão representados. Em azul o colágeno tipo I, em verde a fibronectina e em vermelho a laminina. Estão também representados o sincitiotrofoblasto, o citotrofoblasto, vaso sanguíneo fetal, eritrócitos e os desmossomos.

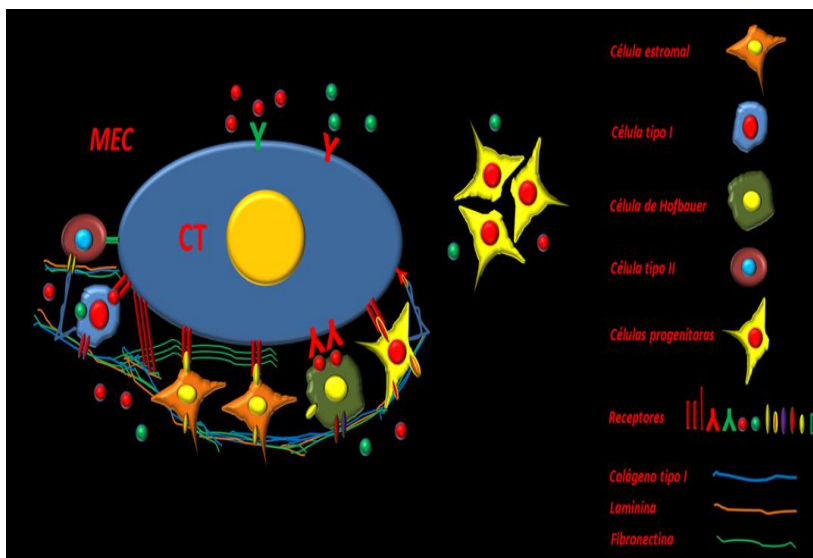


FIGURA 20. Representação esquemática dos diferentes tipos celulares e moleculares, relacionados com uma célula-tronco (CT) da vilosidade coriônica do tecido da placenta humana.

Nos últimos anos, a utilização de células-tronco mesenquimais derivadas da placenta na terapia regenerativa, ganhou um interesse amplo. A inauguração de sociedades internacionais, como Sociedade Internacional de Células-Tronco de Placenta Humana em 2009, revela este interesse. O uso de CTMs é uma alternativa terapêutica promissora, pois a diferenciação dessas células em tecidos mesodermis e não mesodermis possibilita ainda mais, a utilização clínica dessas células não só na terapia em humanos, bem como, em animais (PAROLINI *et al.*, 2011).

Estudos realizados mostrou que células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da placenta humana podem ser facilmente isoladas e expandidas sem alterações das características morfológicas e em meio suplementado com apenas soro fetal bovino (FBS). Portanto, a placenta pode revelar-se uma atrativa e rica fonte de CTMs. A presença de células-tronco no tecido da placenta pode ter grandes implicações (ZONGNING *et al.*, 2006).

Os dados iniciais sobre a capacidade de diferenciação de CTMs são promissores, e pode ter utilizações terapêuticas importantes para estas células. Junto com a facilidade de acesso, e número de celular

abundante, PMSCs pode ser uma atrativa fonte alternativa de células progenitoras ou células-tronco para a investigação. Mais estudos são necessários, para entender melhor a natureza das células derivadas da placenta e como explorar o seu potencial para serem aplicadas na terapia celular (ZONGNING *et al.*, 2006).

Células do estroma da decidua humana podem também, servir como uma potencial fonte para as células-tronco maternas na medicina regenerativa, especialmente em doenças isquêmicas e neuroregenerativas (HAYATI *et al.*, 2011). Desta maneira, a busca por fontes alternativas de células-tronco como o tecido da placenta é muito importante, por ser descartada após o parto. A placenta é um órgão disponível em larga escala, cuja obtenção não está associada a riscos para a saúde da mãe e ou do feto (YEN *et al.*, 2005). CTMs das vilosidades coriônicas de placenta humana a termo é uma fonte atrativa de MSCs para a terapia celular (ALBUMARRE *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, a placenta tornou-se uma fonte muito atraente para o isolamento de células-tronco, tanto hematopoéticas como mesenquimais. As células, derivadas das vilosidades coriônicas e de outras regiões da placenta, podem ser obtidas após o parto. Estas células representam uma fonte alternativa de se obter células-tronco (DELO *et al.*, 2006; DE COPPI *et al.*, 2007) que apresentam boas condições em termos de proliferação e plasticidade (BARLOW *et al.*, 2008; MIHU *et al.*, 2008). Além disso, CTMs da placenta humana tem propriedades superiores de expansão e de aplicação do que as MSCs da medula óssea (BROOKE *et al.*, 2008; HASS *et al.*, 2011).

A placenta pode representar uma alternativa viável com características de expressão de marcadores de pluripotência e também, a incapacidade de formar teratomas em condições permissivas. Enquanto a placenta tem sido tradicionalmente considerada um órgão importante para a manutenção e regulação da troca feto-materna, tornou-se evidente que ela também, pode atuar como um reservatório de células progenitoras, apesar do papel destas células durante a gestação permanecer ainda não esclarecido (BAKSH *et al.*, 2004).

As células-tronco, principalmente as células-tronco adultas, já estão sendo utilizadas em diversas terapias, como tratar defeitos na cartilagem (BRITTBERG *et al.*, 1994), enfarto do miocárdio (ZHANG *et al.*, 2010) e cicatrização de feridas (BROWER *et al.*, 2011). No entanto, a possibilidade de utilização terapêutica das células-tronco está ainda sub-explorada, devido à falta de conhecimentos fundamentais sobre os mecanismos moleculares e celulares que regem as propriedades de proliferação e de diferenciação destas células.

Embora existam vários estudos que descrevem os diferentes tipos de moléculas da MEC no tecido da placenta, a localização e a participação de cada um desses componentes da matriz, ainda necessitam de maiores entendimentos. A compreensão das estruturas celulares e moleculares que compõe o nicho em tecidos e órgãos é de fundamental importância para a compreensão das interações entre as células-tronco e células vizinhas, ou ainda interações com a matriz extracelular que, em combinação com fatores intrínsecos, determinam o comportamento e o destino das células-tronco (MORRISON & SPRADLING, 2008). Este microambiente tridimensional influencia e controla a expressão dos genes que definem as propriedades das células-tronco, ou seja, a auto-renovação ou a diferenciação (BAJADA *et al.*, 2008).

São vários os trabalhos que investigam a placenta humana e relatam que este órgão potencialmente possui um grande número de células-tronco, tanto hematopoéticas, como mesenquimais. São células relativamente fáceis de isolar, expandir e se diferenciar em diferentes tipos celulares. O estudo com células da placenta apresenta uma série de vantagens como, o fácil acesso do material biológico, a relativa facilidade de isolamento dessas células, e não há implicações de ordem ética e religiosa na utilização desses tecidos. São células viáveis para uma série de abordagens terapêuticas, que são utilizadas na recuperação de tecidos e órgãos danificados (DELO *et al.*, 2006; PORTMANN-LANZ *et al.*, 2006; STRAKOVA *et al.*, 2008).

Com os resultados obtidos neste trabalho será possível, fazer uma melhor avaliação dos diferentes tipos de células e moléculas que fazem parte do nicho (microambiente) das células-tronco, nas diferentes regiões do tecido da placenta humana. Podemos afirmar também, que a placenta humana é uma fonte favorável de células-tronco e/ou progenitoras. Estas células podem ser isoladas e cultivadas, apresentam um potencial de auto-renovação e de diferenciação, que poderão ser utilizadas para uma série de aplicações terapêuticas.

Para uma melhor compreensão dos mecanismos tanto celulares, quanto moleculares envolvidos no desenvolvimento e nas funções dessas células-tronco, será necessário estabelecer metodologias mais seguras e mais eficientes para o isolamento, a purificação e a caracterização das células-tronco e/ou progenitoras. O estabelecimento dessas metodologias poderá no futuro, contribuir significativamente para o desenvolvimento de terapias celulares cada vez mais eficientes, no tratamento de um grande número de doenças.

As características do nicho e a sinalização provavelmente são específicas em cada instante. Os mecanismos que direcionam as células-tronco adultas para uma determinada linhagem são em grande parte desconhecidos. Os sinais que controlam a sobrevivência, a proliferação e a diferenciação destas células precisam ser mais bem compreendidos.

A promessa da medicina regenerativa e também curativa baseada em células-tronco, depende da identificação de mecanismos e de moléculas que controlam e medeiam a diferenciação de uma determinada linhagem de célula, e as cascatas de sinalização que controlam a sobrevivência e proliferação das células no tecido.

Portanto, o uso de células-tronco na medicina regenerativa, ainda é limitado pela dificuldade de estabelecer um nicho adequado para que o enxerto possa se estabelecer adequadamente e assim, diferenciar no tecido alvo. O entendimento dos elementos que possam atuar na regulação deste nicho são os pontos fundamentais, que podem direcionar uma terapia mais eficiente e adequada ao reparo de um tecido alvo. Sendo assim, estudos que possam esclarecer as interações das células-tronco com diferentes elementos do seu nicho, podem ser os fatores que determinam a possibilidade de maior sucesso terapêutico na medicina regenerativa, pois se entendendo os requerimentos do nicho, é possível, tentar melhorar o acesso de células-tronco a estes elementos.

6. CONCLUSÃO

1. Colágeno tipo I é encontrado nas regiões da placenta a termo tanto no estroma das vilosidades coriônicas, bem como, na região da decídua basal.
2. Polissacarídeos ácidos se distribuem na placenta nas regiões do sinciciotrofoblasto, no estroma, na parede dos vasos sanguíneos e na decídua basal.
3. CTMs se organizam na região das vilosidades coriônicas da placenta, bem como, na decídua basal.
4. CTHs parece que se organizam associadas à CTMs nas regiões das vilosidades coriônicas e na decídua basal.
5. A funcionalidade do tecido tanto bioquimicamente quanto metabolicamente, é observada mesmo na placenta a termo, sem indícios de queda na sua atividade celular.

Consequentemente a placenta possui um nicho organizado para a manutenção e diferenciação de diferentes tipos de células-tronco. Possivelmente, há um gradiente de moléculas organizadoras do nicho que, dependendo da região de contato com células-tronco, ocorre diferenciação ou manutenção de *pool* de células tronco no tecido.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDI, M., FOSTER, M., WOOD, K. D., COLVIN, G. A., McLEAN, S. D., JOHNSON, K. W. & GREER, D. A. Haematopoietic stem cells participate in muscle regeneration. *British Journal of Haematology* [S.I.], v.138, nº6, p.792-801, 2007.

ADAIR, F. L. & THELANDER, H. A study of the weight and dimensions of the human placenta in its relation to the weight of newborn infant. *American Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 10, p.172-205, 1925.

AKITA, K., VON HOLST, A., FURUKAWA, Y., MIKAMI, T., SUGAHARA, K., FAISSNER, A. Expression of multiple chondroitin/dermatan sulfotransferases in the neurogenic regions of the embryonic and adult central nervous system implies that complex chondroitin sulfates have a role in neural stem cell maintenance. *Stem Cells*, 26, p.798-809, 2008.

ALBERTS, B., BRAY, D., HOPKIN, K., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. *Fundamentos de Biologia Celular*. 3ª ed., Ed. Artmed, Porto Alegre. p.844, 2011.

ALBUMAREE, M. H., AL JUMAH, M. A., KALIONIS, B., JAWDAT, D., AL KHALDI, A., ALTALABANI, A. A., KNAWY, B. A. Phenotypic and Functional Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Chorionic Villi of Human Term Placenta. *Stem Cell Reviews*, v.9, nº1, p.16-31, 2013.

ALVAREZ-BUYLLA, A., MERCHANT-LARIOS, H. Mouse primordial germ cells use fibronectin as a substrate for migration. *Exp Cell Res*, v.165, p.362-368, 1986.

ALVAREZ-SILVA, M., BELO-DIABANGOUAYA, P., SALAÜN, J. and DIETERLEN-LIÈVRE, F. Mouse placenta is a major hematopoietic organ. *Development* [S.I.], v.130, nº22, p.5437-5444, 2003.

AMABILE, G.; MEISSNER, A. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol Med*, 15, p.59-68, 2009.

AMADO, L. C., SALIARIS, A. P., SCHULERI, K. H., ST JOHN, M., XIE, J. S., CATTANEO, S., et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci, USA*, v.102, n°32, p.11474-9, 2005.

AMENTA, P. S., GAY, S., VAHERI, A. and MARTINEZ-HERNANDES, A. The extracellular matrix is integrated unit: ultrastructural localization of collagen types I, III, IV, V, VI, fibronectin and laminin in human term placenta. *Coll Rel Res*, 6, p.125-152, 1986.

ANKER, P. S., SCHERJON, S. A., KLEIBURG-VANDER KEUR, C. GROOT-SWINGS, G. M. J. S., CLASS, F. H. J. FIBBE, W. E., KANHAI, H. H. H. Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta. *Stem Cells [S.I.]*, v.22, n°7, p.1338-1345, 2004.

ANISIMOV, S. V., CHRISTOPHERSEN, N. S., CORREIA, A. S., LI, J. Y., BRUNDIN, P. "Neuro Stem Chip": a novel highly specialized tool to study neural differentiation pathways in human stem cells. *BMC Genomics*, 8, p.46, 2007.

APLIN, J. D. & CAMPBELL, S. An immunofluorescence study of extracellular matrix associated with cytotrophoblast of the chorion laeve. *Placenta*, 6, p.469-479, 1985.

AVOTS, A., HARDER, F., SCHMITTWOLF, C., PETROVIC, S., MÜLLER, M. A. Plasticity of hematopoietic stem cells and cellular memory. *Immunol Rev [S.I.]*, v.187, p.9-21, 2002.

AYAD, S., BOOT-HANDFORD, R. P., HUMPHRIES, M. J., KADLER, K. E. SCSHUTTLEWORTH, C. A. The Extracellular Matrix Facts Book. San Diego. Academic Press, 1994.

BAJADA, S., MAZAKOVA, I., RICHARDSON, J. B., ASHAMMKHI, N. Updates an cells and their applications in regenerative medicine, 2, n°4, p.169-83, 2008.

BALKWILL, F. The molecular and celullar biology of the chemokines. *J Viral Hepat*, 5, p.1-14, 1998.

BAKSH, D., SONG, L., TUAN, R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*, 8, p.301-16, 2004.

BARBARA, N. P.; WRANA, J. L. & LETARDE, M. Endoglin is an accessory protein that with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem*, 247, nº2, p.584-594, 1999.

BARLOW, S., BROOKE, G., CHATTERJEE, K. et al. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 17, p.1095-107, 2008.

BARKER, J. N., WAGNER, J. E. Umbilical cord blood transplantation: current state of the art. *Curr Opin Oncol [S.I.]*, v. 14, nº2, p. 160-164, 2002.

BARROS, C.S., FRANCO, S. J, MÜLLER, U. Extracellular matrix: functions in the nervous system, *Cold Spring Harb. Perspect Biol*, 3a005108, 2011.

BARRY, F., BOYNTON, R. E., LIU, B., MURPHY, J. M. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix componentes. *Exp Cell Res*, 268, p.189-200, 2001.

BEÇAK, W. & PAULETE, J. Técnicas de Citologia e Histologia. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, v.1, p.306, 1976.

BENIRSCHKE, K. Examination of the placenta. *Obst & Gynec*, 18, p.309, 1961.

BERNFELD, M., GOTTE, M., PARK, P. W., REIZES, O., FITZGERALD, M.L., LINCECUM, J., ZAKO, M. Functions of cell surfasse heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem*, 68,729-777, 1999. *Biol*, v.2, p.7-24, 2007.

BERNFELD, M., PERRIMON, N. Specificities of heparan sulfate proteoglycans in developmental processes. *Nature*, in press, 2000.

BIANCO, P., GEHRON, R. P. Marrow stromal stem cells. *J. Clin Invest*, 105, nº12, p.1663-8, 2000.

BLAU, H. M., BRAZELTON, T. R., WEIMANN, J. M. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*, 105, nº7, p.829-41, 2001.

BOSSOLASCO, P., MONTEMURRO, T., COVA, L., et al. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Res*, 16, p.329-36, 2006.

BRITTBERG, M., LINDAHL, A., NILSSON, A., OHLSSON, C., ISAKSSON, O. & PETERSON, L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *The New England Journal of Medicine*, v.331, nº14, p.889-895, 1994.

BROOKE, G., TONG, H., LEVESQUE, J. P., ATKINSON, K. Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta. *Stem Cells Dev*, 17, p.929-940, 2008.

BROXMEYER, H. E., SROUR, E., ORSCHELL, C., et al. Cord blood stem and progenitor cells. *Methods Enzymol*, 419, p.439-73, 2006.

BROWER, J., BLUMBERG, S., CARROLL, E. et al. Mesenchymal stem cell therapy and delivery systems in nonhealing wounds. *Adv Skin Wound Care*, 24, p.524-532, 533-4, 2011.

BRYANT-GREENWOOD, G. D. The Extracellular of the Human Fetal membranes: Structure and Function. *Placenta*, 19, p.1-11, 1998.

BURGESON, R. E., EL ADLI, F. A., KAITILA, I. & HOLLISTER, D. W. Fetal membrane collagens: Identification of two new collagen alpha chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 73, p.2579-2583, 1976.

BYDŁOWSKI, S. P., DEBES, A. A., MASELLI, L. M. F., JAMZ, F. J. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev. Bras. Hematol Hemoter*, 31(Supl. 1), p.25-35, 2009

CAMASSOLA, M., CHAGASTELLES, P. C. e NARDI, N.B. Embriologia, Cap. 9, 3ª edição. Garcia, S. M. L. e Fernandez, C. G., 2012.

CAPLAN, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*, 213, p.341-347, 2007.

CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *Journal of Pathology*, v.217. p.318-324, 2009.

CASTELLUCCI, M., SCHEPER, M., CELONA, A., and KAUFMANN, P. The development of the human placental villous tree. *Anatomy and Embriology*, 181, p.117-128, 1990.

CHAMMAS, R. AND BRENTANI, R. Integrins and metastases: overview. *Tumour Biol*, 12, 309-320, 1991.

CHANG, C. M., KAO, C. L., CHANG, Y. L., et al. Placenta- derived multipotent stem cells induced to differentiate into insulin-positive cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 357, p.414-20, 2007.

CHATAKUN, P., NÚÑEZ-TOLDRA, R., DÍAZ LÓPEZ, E. J., GIL-RECIO, C., MARTÍNEZ-SARRÀ, E., HERNÁNDEZ-ALFARO, F., FERRÉS-PADRÓ, E., GINER-TARRIDA, L., ATARI, M. The effect of five proteins on stem cells used for osteoblast differentiation and proliferation: a current review of the literature. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.71, p.113-142, 2014.

CHEIFETZ, S., BELLÓN, T., CALÉS, C., VERA, S., BERNABEU, C., MASSAGUÉ, J. & LETARDE, M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem*, 267, nº27, p.19027-19030, 1992.

CHEN, X. D., DUSEVICH, V., FEND, J. Q., MANOLAGAS, S. C. and JILKA, R. L. et al. Extracellular Matrix Made by Bone Marrow Cells Facilitates Expansion of Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells and Prevents Their differentiation Into Osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.22, nº12, p.1943-1956, 2007.

CHETOUI, N., GENDRON, S., CHAMOUX, E., AOUDJIT, F. Collagen type I-mediated activation of ERK/MAP Kinase is dependent on Ras, Raf-1 and protein phosphatase 2A in Jurkat T cells. *Mol Immunol*, 43, p.1687-1693, 2006.

CHIEN, C. C., YEN, B. L., LEE, F. K., LAI, T. H., CHEN, Y. C., CHAN, S. H., HUANG, H. I. In Vitro Differentiation of Human Placenta-Derived Multipotent Cells into Hepatocyte-Like Cells. *Stem Cells [S.I.]*, v.24, n°7, p.1759-1768, 2006.

CHUNG, E., RHODES, R. K. AND MILLER, E. Isolation of three collagenous components of probable basement membrane origin from several tissues. *Biochem Biophys Res Comm*, 71, p.1167-1174, 1976.

COHEN, Y., NAGLER, A. Umbilical cord blood transplantation - how, when and for whom? *Blood Ver*, 18, p.167-179, 2004.

COLAGNATO, H., YURCHENKO, P. D. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn*, 218, p.213, 2000.

COONS, A. H., CREECH, H. J., JONES, R. N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med*, 47, p.200-202, 1941.

COVAS, D. T., SIUFI, J. L. C., SILVA, A. R. L. and ORELLANA, M. D. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res [S.I.]*, v.36, n°9, p.1179-1183, 2003.

CRISAN, M., YAP, S., CASTEILLA, L., CHEN, C. W., CORSELLI, M., PARK, T.S., ANDRIOLO, G., SUN, B., ZHENG, B., ZHANG, L., NOROTTE, C., TENG, P.N., TRAAS, J., SCHUGAR, R., DEASY, B. M.; BADYLAK, S., BQHRING, H. J., GIACOBINO, J. P., LAZZARI, L., HUARD, J., PÉAULT, B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3, p.301-313, 2008.

CZYZ, J., WOBUS, A. M. Embryonic stem cell differentiation: The role of extracellular factors. *Differentiation [S.I.]*, v.68, n°4-5, p.167-174, 2001.

DAN, Y. Y., YEOH, G. C. Liver stem cells: a scientific and clinical perspective. *J Gastroenterol Hepatol*, v.23, n°5, p.687-698, 2008.

DARLEY, W. P., PETERS, S. B. LARSEN, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *Jornal of Cell Science*, v.121, n°3, p.255-264, 2008.

DAZZI, F., RAMASAMY, R., GLENNIE, S., JONES, S. P., ROBERTS, I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Reviews [S.I.]*, v.20, n°3, p.161-171, 2006.

DEANS, R. J., MONSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potencial clinical uses. *Exp Hematol*, 28, n°8, p.875-84, 2000.

DE COPPI, P., BARTSCH, G., SIDDIQUI, M.M., et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*, 25, p.100-6, 2007.

DE GEMMIS, P., LAPUCCI, C., BERTELLI, M., TOGNETTO, A., FANIN, E., VETTOR, R., et al. A real-time PCR approach to evaluate adipogenic potential of amniotic fluid-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 15, n°5, p.719-28, 2006.

DELO, D. M., DE COPPI, P., BARTSCH, G. et al. Amniotic fluid and placental stem cells. *Methods Enzymol*, 419, p.426-38, 2006.

DEMIR-WEUSTEN, A. Y., SEVAL, Y. KAUFMANN, P., DEMIR, R. YUCEL, G.; HUPPERTZ, B. Matrix metalloproteinases-2, 3 and -9 in human term placenta. *Acta Histochem*, 10, p.403-412, 2007.

DIERON, D. & BRYANT-GREENWOOD, G. D. Collagens, collagenolytic enzymes and inhibitors in the human fetal membranes and decidua. *Trophoblast Research*, 5, p.205-216, 1991.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, p.315- 317, 2006.

DRISCOLL, S. G.; LANGSTON, C. Placental examination in a clinical setting. *Arc Pathol Med*, 115, n°7, p.668-71, 1991.

DUBAND, J. L.; THIERY, J. P. Distribution of fibronectin in the early phase of avian cephalic neural crest cell migration. *Dev Cell Biol*, v.108, p.2507-2517, 1982.

DUBAND, J. L., THIERY, J. P. Distribution of laminin and collagens during avian neural crest development. *Development*, 101, p.461-478, 1987.

EGUSA, H., SCHWEIZER, F. E., WANG, C. C., MATSUKA, Y. and NISHIMURA, I. Neuronal differentiation of bone marrow-derived stromal stem cells involves suppression of discordant phenotypes through gene silencing. *Journal of Biological Chemistry [S.I.]*, v. 280, p.23691-23697, 2005.

ELKBLÖM, - Biological activity of laminin. v. 27, issue 4. *Journal of Cellular Biochemistry*, p.1981.

ERICKSON, H. P., CERRELL, N., MCDONAGH, J. Fibronectin molecule visualized in electron microscopy: a long, thin, flexible strand. *J. Cell Biol*, v.91, p.673-678, 1981.

ERICKSON, C. A. Control of pathfinding, by the avian trunk neural crest. *Development*, 103, Suppl, p.63-80, 1988.

EVANS, M. J. & KAUFMAN, M. H. 'Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.' *Nature*, 292, n°5819, p.154-156, 1981.

FODOR, W. L. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol*, 1, p.102, 2003.

FUCHS, E. Finding One's Niche in the Skin. *Cell Stem Cell [S.I.]*, v.4, n°6, p.499-502, 2009.

FURUTO, D. K., & MILLER, E. J. *J Biol Chem*, 255, p.290-295, 1980.

GARCIA, S. M. LAUER & FERNÁNDEZ, C. G. *Embriologia*, 3 ed., Ed. Artmed, p.651, 2012.

GARDNER & HYNES. Interaction of fibronectin with its receptor on platelets. *Cell*, 42, p.439-448, 1985.

GEKAS, C., Dieterlen-LIÈVRE, F., ORKIN, S. H., MIKKOLA, H. K. A. The Placenta Is a Niche for Hematopoietic Stem Cells. *Developmental Cell [S.I.]*, v.8, n°3, p.365-375, 2005.

GÓMEZ, R. P., MATAMALA, F. & ROJAS, M. Características Morfológicas y Morfométricas de la Placenta de Término, en Recién Nascidos Pequeños para la Edad Gestacional (PEG) en la Ciudad de Temuco-Chila. *Inst J Morphol*, 26, n°3, p.615-621, 2008.

GREENBERG, J. H., SEPPA, S., SEPPA, H., HEWITT, A. T. Role of collagen and fibronectin in neural crest cell adhesion and migration. *Dev Biol*, 87, p.259-66, 1981.

GRONTHOS, S. et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, v.81, n°8, p.531-535, 2002.

GRONTHOS, S., ARTHUR, A., BARTOLDI, P. M. & SHI, S. A method to isolate and culture expand human dental pulp stem cells. *Methods in Molecular Biology*, 698, p.107-121, 2011.

GROZA, I., PALL, E., GROZ, D., SORHAU, O., TOMULEASA, C., CENARIU, M., ILEA, I. C., GROZA, E. Evaluation of multipotent mesenchymal stem cells from human placenta. *Lucrari Tiinlifice Medicina Veterinara*, vol.Xliii, n°2, p.9-14, 2010.

GUAN, J. L., TREVITHICK, J. E., HYNES, R. O. Retroviral expression of alternatively spliced forms of rat fibronectin. *J Cell Biol*, v.110, p.833-847, 1990.

GUNSILIUS, E., GASTL, G., PETZER, A.L. Hematopoietic stem cells. *Biomed Pharmacother [S.I.]*, v.55, n°4, p.186-194, 2001.

HAMILTON, W. J., BOYD, J. D. and MOSSMAN, H. W. *Embriologia Humana*, Inter-Médica. Buenos Aires, 1964.

HASHIMOTO, J., KARIYA, Y., MIYAZAKI, K. Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal

stem cells by laminin-5 (laminin-332). *Stem Cells*, 24, n°11, p.2346-54, 2006.

HASS, R., KASPER, C., BÖHM, S., et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*, 9, p.12, 2011.

HAYATI, A. R., NUR FARIHA, M. M., TAN, G. C., et al. Potential of human decidua stem cells for angiogenesis and neurogenesis. *Arch Med Res*, 42, p.291-300, 2011.

HAY, E. D. *Cell Biology of the Extracellular Matrix*, ed. by Hay, E. D. Plenum Press, New York, 1981.

HEASMAN, J., HYNES, R. O., SWAN, A. P., THOMAS, V., WYLIE, C. C., Primordial germ cells of *Xenopus* embryos: the role of fibronectin in their adhesion during migration. *Cell*, v.27, p.437-447, 1981.

HEINO, J., KAPYLA, J. Cellular receptors of extracellular matrix molecules. *Curr Pharm Des*, 15, p.1309-1317, 2009.

HEMBERGER, M., YANG, W., NATALE, D. et al.: Stem cells from fetal membranes. A Workshop Report. *Placenta*, 22, S17-S19, 2008.

HIPP, J., ATALA, A. Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Rev*, 4, p.3-11, 2008.

HUMPHRIES, M. J., YAMADA, K. M. Cell interaction sites of fibronectin in adhesion and metastasis. In: Edelman G. M., Cunningham B. A., Thiery J. P. eds. *Morphoregulatory molecules*. New York. Neuroscience, p.17-172, 1990.

HU, Y., LIAO, L., WANG, Q., MA, L., MA, G., JIANG, X., AND ZHAO, R. C. Isolation and Identification of Mesenchymal Stem Cells from Human Fetal Pancreas. *J Lab Clin Med*, vol. 141, n°5, p.342-349, 2003.

HYNES, R.O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, 326, p.1216-1219, 2009.

IGURA, K., ZHANG, X., TAKAHASHI, K., MITSURU, A., YAMAGUCHI, S., TAKASHI, T. A. Isolation and characterization of

mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy*, 6, p.543-53, 2004.

IOZZO, R. V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem*, 67, p.609-652, 1998.

ISEMURA, M., YAMAGUCHI, Y., MUNOKATA, H., AIKAWA, J., KAN, M., YAMANE, I., YOSIZAWA, Z. Isolation and characterization of human placenta fibronectin. *J Biochem (Tokyo)* 96, p.163-169, 1984.

JIANG, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature [S.I.]*, v.418, n°6893, p.41-49, 2002.

JONES, D. L., WAGERS, A. J. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol [S.I.]*, v.9, n°1, p.11-21, 2008.

JONES, L., FULLER, M. T. *Essentials of Stem Cell Biology*. 2nd Edition. Edited by Robert Lanza. Elsevier. *Cap Stem Cell Niches*, p.61-61, 2009.

KANAYAMA, N., TERAOKA, T., KAWASHIMA, Y., HORIUCHI, K. & FUJIMOTO, D. Collagen types in normal and prematurely ruptured amniotic membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 153, p.899-903, 1985.

KARAHUSEYINOGLU, S., CINAR, O., KILIC, E., et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells*, 25, p.319-31, 2007.

KEREVER, A., SCHNACK, J., VELLINGA, D., ICHIKAWA, N., MOON, C., ARIKAWA-HIRASAWA, E., EFIRD, J. T., MERCIER, F. Novel extracellular matrix structures in the neural stem cell niche capture the neurogenic factor fibroblast growth factor 2 from the extracellular milieu. *Stem Cells*, 25, p.2146-2157, 2007.

KIRSCHSTEIN, R., SKIRBOLL, L. R. *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*, US Department of Health and Human Services. NIH, 2001.

KLEES, R. F., SALASZNYK, R. M., KINGSLEY, K., WILLIAMS, W. A., BOSKEY, A., AND PLOPPER, G.E., Laminin-5 Induces Osteogenic Gene Expression in Human Mesenchymal Stem Cells through an ERK-Dependent Pathway. *Mol Biol Cell*, v.16, n°2, p.881-890, 2005.

KLUG, M. G., SOONPAA, M. H., KOH, G. Y., FIELD, L. J. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Inv*, 98, p.216-224, 1996.

KOHNEN, G. KERTSCHANSKA, S., DEMIR, R., KAUFMAN, P. Placental villous stroma as a model system for myofibroblast differentiation. *Histochemistry and Cell Biology*, v.105, Issue 6, p. 415-429, 1996.

KOLF, C., CHO, E. & TUAN, R. S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy [S.I.]*, v.9, n°1, p.204, 2007.

KORNBLIHTT, A. R., VIBE-PEDERSEN, K., BARALLE, F. E. Isolation and characterization of cDNA clones for human and bovine fibronectins. *Proc Natl Acad Sci*, v.80, p.3218-3222, 1983.

KULTERER, B., FRIEDL, G., JANDROSITZ, A., SANCHEZ-CABO, F., PROKESCH, A., PAAR, C., et al. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*, 8, p.70, 2007.

KULAWIGA, R., KRUGERA, J.P., KLEINB, O., KONTHURC, Z., SCHUTTED, H., KLOSEB, J., KAPSA, C., ENDRESA, M. Identification of fibronectin as a major factor in human serum to recruit subchondral mesenchymal progenitor cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45, p.1410-1418, 2013.

LEE, O. K. , KUO, T. K., CHEN, W. M., LEE, K. D., HSIEH, S. L., and CHEN, T. H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood [S.I.]*, v.103, n°5, p. 1669-1675, 2004.

LI, L. Finding the Hematopoietic Stem Cell Niche in the Placenta. *Developmental Cell* [S.I.], v. 8, n°3, p.297-298, 03, 2005.

LOCKWOOD, C. J., SENYEI, A. E., DISCHE, M. R., CASAL, D., SHAH, K. THUMG, S. N., JONES, L., DELIGDISCH, L. & GARITE, T. J. Fetal fibronectin in cervical and vaginal secretions as a predictor of preterm delivery. *New England Journal of Medicine*, 325, p.669-674, 1991.

LUSTER, A. D. "Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation". *The New England journal of medicine*, v. 338, p.436-45, 1998.

MALAK, T. M., OCKLEFORD, C. D., BELL, S. C., DALGLEISH, R., BRIGHT, N. & MACVICAR J. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term fetal membranes. *Placenta*, p.385-406, 1993.

MALLORY, F. B. & WRIGHT, J. H. *Pathological Technique: a practical manual for workers in pathological histology and bacteriology: including directions for the performance of autopsies and for clinical diagnosis by laboratory methods*. First published, 1897.

MARCUS, A. J, COYNE, T. M., RAUCH, J., WOODBURY, D., BLACK, I. B. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. *Differentiation*, 76, p.130-44, 2008.

MCNIECE, I. K., ALMEIDA-PORADA, G., SHPALL, E. J., ZANJANI, E. Ex vivo expanded cord blood cells provide rapid engraftment in fetal sheep but lack long-term engrafting potential. *Exp Hematol*, 30, p.612-6, 2002.

MARTIN, G. R. "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells". *Proc Natl Acad Sci USA*, 78, n°12, p.7634-7638, 1981.

MARTINI, M. M., SILVA-JEREMIAS, T., KOHLER, M. C., MAROSTICA, L. L., GONÇALVES TRENTIN, A., ALVAREZ-

SILVA, M. Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells Acquire Neural Phenotype Under the Appropriate Niche Conditions. *DNA and Cell Biology*. February, 32, n°2, p.58-65, 2013.

MIHU, C. M., MIHU, D., COSTIN, N., et al. Isolation and characterization of stem cells from the placenta and the umbilical cord. *Rom J Morphol Embryol*, 49, 441-6, 2008.

MIKI, T., LEHMANN, T., CAI, H., STOLZ, D. B., STROM, S. C. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*, v.23, n°10, p.1549-1559, 2005.

MIKI, T., MITAMURA, K., ROSS, M., STOLZ, D. B., STROM, S.C. Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *Journal of Reproductive Immunology [S.I.]*, v.75, p.91-96, 2007.

MIKKOLA, H. K. A., GEKAS, C., ORKIN, S. H., DIETERLEN-LIEVRE, F. Placenta as a site for hematopoietic stem cell development. *Experimental Hematology [S.I.]*, v.33, n°9, p.1048-1054, 2005.

MINEGISHI, M., OHASHI, Y., KUMAKI, S., SASAHARA, Y., HAYASHI, T., ASADA, H., OKUYAMA, T., HAKOZAKI, I., SATO, T., and TSUCHIYA, S. Successful umbilical cord blood transplantation from an unrelated donor for a patient with Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Bone Marrow Transplant. [S.I.]*, v.27, n°8, p.883-886, 04, 2001.

MIMEAULT, M., HAUKE, R. & BATRA, S. K. "Stem cells: a revolution in therapeutics – recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies", *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 82, p.252-264, 2007.

MITALIPOV, S., WOLF, D. P. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 114, p.185-199, 2009.

MODESTI, A., SCARPA, S., D’ORAZI, G., SIMONELLI, L. SC CARAMIA, F. G. Localization of type IV and V collagen in the stroma of the human amnion. *Developments in Ultrastructure of Reproduction*, 296, p.459-463, 1989.

MOHRI, H. Fibronectin and integrins interactions. *J Invest Med*, v.44, p.429-44, 1996.

MOORE, k. L., PERSAUD, T. V. N. *Embriologia Clínica*, Editora Elsevier Ltda, 8 ed., 2008.

MOORE, K. A., LEMISCHKA, I. R. *Science*, 311, p.1880-1885, 2006.

MORRISON, S. J.; SHAH, N. M.; ANDERSON, D. J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, 88, p.287-298, 1997.

MORRISON, S. J., SPRADLING, A. C. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, 132, n°4, p.598-611, 2008.

MOULD, A. P., KOMORIYA, A., YAMADA, K. M., HUMPHRIES, M. J. Affinity chromatographic isolation of the melanoma adhesion receptor for the IIICS region of fibronectin and its identification as the integrin $\alpha 4 \beta 1$. *J Biol Chem*, v.265, p.4020-4024, 1991.

MYLLYHARJU, J. and K. I. KIVIRIKKO. Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med*, 33, p.7-21, 2001.

NAGY, A., et al. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.90, n°18, p.8424-8428, 1993.

SNG, J. & LUFKIN, T. "Emerging stem cell therapies: treatment, safety, and biology", *Stem Cells International*, v.2012, p.521343, 2012.

PAPPA, K. I, ANAGNOU, N. P. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med*, 4, p.423-33, 2009.

PAROLINI, O., ALVIANO F., BAGNARA, G. P., BILIC, G., BÜHRING, H. J., EVANGELISTA, M., NAKAJIMA, H., NIKAIDO, T., PORTMANN-LANZ, C. B., SANKAR, V., SONCINI, M., STADLER, G., SURBEK, D., TAKAHASHI, T. A., REDL, H., SAKURAGAWA, N., WOLBANK, S., ZEISBERGER, S., ZISCH, A., STROM, S. C. Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International

Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*, v.26, n°2, p.300-311, 2008.

PAROLINI, O., ALVIANO, F., BERGWERF, I., BORASCHI D, DE BARI, C., DE WAELE, P., DOMINICI, M., EVANGELISTA, M., FALK, W., HENNERBICHLER, S., HESS, D.C., LANZONI, G., LIU, B., MARONGIU, F., MCGUCKIN, C., MOHR, S., NOLLI, M.L., OFIR, R., PONSARTS, P., ROMAGNOLI, L, SOLOMON A, SONCINI M, STROM S, SURBEK D, VENKATACHALAM S, WOLBANK S, ZEISBERGER, S., ZEITLIN, A., ZISCH, A., BORLONGAN, C. V. Toward cell therapy using placenta-derived cells: disease mechanisms, cell biology, preclinical studies, and regulatory aspects at the round table. *Stem Cells Dev*, 19, n°2, p.143-54, 2010.

PAROLINI, O., ALVIANO, F., BETZ, A. G., et al. Meeting report of the first conference of the International Placenta Stem Cell Society (IPLASS). *Placenta*, 32(Suppl 4):S, p.285-90, 2011.

PAUNESCU, V., DEAK, E., HERMAN, D., SISK, I. R., TANASIE, G., BUNU, C., ANGHEL, S., TATU, C. A., OPREA, T. I., HENSCHLER, R., RÜSTER, B., BISTRAN, R., SEIFRIED, E. In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. *J Cell Mol Med*, 11, p.502–508, 2007.

PERRIS, R., PAULSSON, M., BRONNER-FRASER, M. Molecular mechanisms of neural crest cell migration on fibronectin and laminin. *Dev. Biol*, 136, p.222-238, 1989.

PERRIS, R., BRANDENBERGER, R., CHIQUET, M. Differential neural crest cell attachment and migration on avian laminin isoforms. *Int J Dev Neurosci*, 14, p.297–314, 1996a.

PERRIS, R. The extracellular matrix in neural crest cell migration. *TINS*, 20, p.23-31, 1997.

PETERSEN, T. E., THOGERSEN, H. C., SKORSTENGAARD, K., VIBE-PEDERSEN, K., SOTTUP-JENSEN, L., MAGNUSSON, S. Partial primary structure of bovine plasma fibronectin, three types of internal homology. *Proc Natl Acad Sci*, v.80, p.137-141, 1983.

PETITOU, M., HERAULT, J. P., BERNAT, A., DRIGUEZ, P. A., DUCHAUSSOY, P., LORMEAU, J.C., HERBERT, J. M. Synthesis of

thrombin-inhibiting heparina mimetics without side effects. *Nature*, 398, p.417-422, 1999.

PIERCHBACHER, M. D., RUOSLAHTI, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, v.309, p.30-33, 1984.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potencial of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v.284, p.143-147, 1999.

POCHAMPALLY, R. R., SMITH, J. R., YLOSTALO, J. and PROKOP, D. J. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. *Blood [S.I.]*, v.103, nº5, p.1647-1652, 2004.

PORTMANN-LANZ, C. B., SCHOEBERLEIN, A., HUBERA, et al. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol*, 194, p.664-73, 2006.

PRANKE, P. A importância de discutir o uso de células-tronco embrionárias para fins terapêuticos. *Cienc Cult*, v.56, nº3, p.33-38, 2004.

PREDESCU, S. A., PREDESCU, D. N., PALADE, G. E. Plasmalemmal vesicles function as transcytotic carriers for small proteins in the continuous endothelium. *Am J Physiol*, 272, H937-H949, 1997.

PRESNELL, S.C., PETERSEN, B. & HEIDARAN, M. "Stem cells in adult tissues". *Semin Cell Dev Bio*, 13, nº5, p.369-376, 2002.

PREYNAT-SEAUVE, O., KRAUSE, K. H. Stem cell sources for regenerative medicine: the immunological point of view. *Semin Immunopathol*, 33, p.519-524, 2011.

PROCKOP, D. J. & KIVIRIKKO, K. I. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annual Reviews of Biochemistry*, 64, p.403-434, 1995.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain for electron microscopy. *J Cell Biol*, 17, p.208, 1963.

ROBERTSON, J. A. 'Human embryonic stem cell research: ethical and legal issues'. *Nat Rev Genetic*, 2, nº1, p.74-78, 2001.

ROMANOV, Y. A., SVINTSITSKAYA, V. A. and SMIRNOV, V. N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells [S.I.]*, v.21, nº1, p.105-110, 2003.

ROSENBERG, R. D., SHWORAK, N. W., LIU, J., SCHWARTZ, J. J., ZHANG, L. Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system .Specific structures emerge but howis synthesis regulated? *J Clin Investig*, 100, S, p.67-75, 1997.

ROUBELAKIS, M. G., PAPPA, K. I., BITSIKA, V., et al. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 16, p.931-52, 2007.

SALASZNYK, R. M., WILLIAMS, W. A., BOSKEY, A., BATORSKY, A., and PLOPPER, G. E. Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiaion of Human Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Biotechnol*, 1, p.24-34, 2004.

SANDERS, R. C., et al. Stem cell research. *Paediatric Respiratory Reviews*, v.7, nº2, p.135-140, 2006.

SANCHEZ-RAMOS, J., SONG, S., CARDOZO-PELAEZ, F., HAZZI, C., STEDEFORD, T., WILLING, A., FREEMAN, T. B., SAPORTA, S., JANSSEN, W., PATEL, N., COOPER, D. R., SANBERG, P. R. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*, 164, p.247-256, 2000.

SARWEY, R. - In: Döderlein, A. - *Tratado de Obstetrícia* - Editorial Labor. S. A., Barcelona, 1938.

SASISEKHARAN, R., ERNST, S., VENKATARAMAN, G. On the regulation of fibroblast growth fator activity by heparin-like glycosaminoglycans. *Angiogenesis*, 1, p.45-54, 1997.

SAVINO, W., VILLA-VERDE, D. M. S., LANNES-VIEIRA, J. Extracellular matrix proteins in intrathymic T-cell migration and differentiation. *Immunol Today*, v.14, p.158-161, 1993.

SCHMIDT, E. C., SANTOS, R., HORTA, P. A., MARASCHIN, M., & BOUZON, Z. L. Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. *Micron*, 41, p.919-930, 2010.

SCHMIDT, E. C., SCARIOTA, L. A., ROVER, T. & BOUZON, Z. L. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. *Micron*, 40, p.860-869, 2009.

SCHNITZER, J. E, ALLARD, J. & Oh, P. NEM inhibits transcytosis, endocytosis, and capillary permeability: Implications of caveolae fusion in endothelia. *Am J Physiol*, 268, H48-H55, 1995.

SCHOENWOLF, G. C. e LARSEN, W. J. *Embriologia Humana de Larsen*, 4^a ed, Ed. Elsevier Ltda, Rio de Janeiro-RJ, 2009.

SCHOFIELD, R. The stem cell system. *Biomed Pharmacother*, 8, p.375-380, 1983.

SHENKE-LAYLAND, K., ANGELIS, E., RHODES, K. E., HEYDARKHAN-HAGVALL, S. Collagen IV Induces Trophoectoderm Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Rev Stem Cells*, 25, p.1529-1538, 2007.

SILVA, W. A., COVAS, D. T., PANEPUCCI, R. A., PROTO-SIQUEIRA, R., SIUFI, J. L. C., ZANETTE, D. L., SANTOS, A. R. D., AND ZAGO, M. A. The Profile of Gene Expression of Human Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, v.21, p.661-669, 2003.

SILVA JÚNIOR, F.C., ODONGO, F.C.A., DULLEY, F.L. Células-tronco hematopoéticas: utilidades e perspectivas. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 31(Supl.1), p.53-58, 2009.

SIRKO, S., VON HOLST, A., WIZENMANN, A., GÖTZ, M., FAISSNER, A. Chondroitin sulfate glycosaminoglycans control

proliferation, radial glia cell differentiation and neurogenesis in neural stem/progenitor cells. *Development*, 134, p.2727-2738, 2007.

SMITH, A. G. HEATH, J. K. DONALDSON, D. D. WONG, G. G. MOREAU, J. STAHL, M. & ROGERS, D. "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides". *Nature*, 336(6200), p.688-690, 1988.

SNYKERS, S. et al. Chromatin remodeling agent trichostatin A: a key-factor in the hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells derived of adult bone marrow. *BMC Dev*, p.7-24, 2007.

SOLTER, D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet*, v.7, n°4, p.319-327, 2006.

SONCINI, M., VERTUA, E., GIBELLI, L., et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J Tissue Eng Regen Med*, v.1, p.296-305, 2007.

SORAYA, A. N., BERTOLDO, S. J, BALDANZI, G. B. Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário: modelo brasileiro. *Revista Uniandrade*, v.13, n°1, FAE, UTFPR e HCUFPR. Curitiba-PR, Brasil. 2012.

SPRADLING, A.; DRUMMOND-BARBOSA, D. & KAI, T. 'Stem cells find their niche.' *Nature*, 414, n°6859, p.98-104, 2001.

PREDESCU, S. A., PREDESCU, D. N. & PALADE, G. E. Plasmalemmal vesicles function as transcytotic carriers for small proteins in the continuous endothelium. *Am J Physiol*, 272, H937-H949, 1997.

STERNBERG, J. & KIMBER, S. J. Distribution of fibronectin, laminin and entactin in the environment of migrating neural crest cells in early mouse embryos. *J Embryol Exp Morph*, 91, p.267-282, 1986.

STRAKOVA, Z., LIVAK, M., KREZALEK, M., IHNATOVYCH, I. Multipotent properties of myofibroblast cells derived from human placenta. *Cell Tissue Res*, 332, p.479-88, 2008.

SPURR, A. R. A loww-viscosity epox resin emedding medium for eléctron microscopy. J Ultrastruct, Res.26, p.31-43, 1969.

SUH, H. N., HAN, H. J. Collagen I regulates the self-renewal of mouse embryonic stem cells through $\alpha 2\beta 1$ integrin and DDR1-dependent Bmi-1. J Cell Physiol, Dec, 226, nº12, p.3422-32. 2011.

TAICHMAN, R. S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. Blood [S.I.], v.105, nº7, p.2631-2639, 2005.

TALÉNS-VISCONTI, R. et al. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. World J Gastroenterol, v.12, nº36, p.5834-5845, 2006.

TAMAGAWA, T., OI, S., ISHIWATA, I., ISHIKAWA, H., NAKAMURA, Y. Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro. Hum Cell, 20, p.77-84, 2007.

TAMKUM, J. W., SCHWARZBAUER, J. E., HYNES, R. O. A single rat fibronectin gene generates three different mRNAs by alternative splicing of a complex exon. Proc Natl Acad Sci, v.81, p.5140-5144, 1984.

TANAKA, M., & MIYAJIMA, A. Identification and isolation of adult liver stem/progenitor cells. Methods in Molecular Biology, 826, p.25-32, 2012.

TERRANOVA, V. P., ROHRBACH, D. H., MARTIN, G. R. Role of laminin in the attachment of PAM 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen, v.22, p.719-726, 1980.

THOMSON, J. A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S. S., WAKNITZ, M. A., SWIERGIEL, J. J., MARSHALL, V. S. & JONES, J. M. 'Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts'. Science, 282, nº5391, p.1145-1147, 1998.

TIMOTHY, W. L., ANDERSON, C. L., ROBSON, M. J. The Endothelium but not the Syncytiotrophoblast of Human Placenta Expresses Caveolae. Placenta, v.23, p.640-652, 2002.

TIMPL, R., JOHANSSON, S., VAN DELDEN, V., OBERBÄUMER, I., HÖK, M. Characterization of protease-resistant fragments of laminin mediating attachment and spreading of rat hepatocytes. *J Biol Chem*, Jul 25, 258, n°14, p.8922-8927, 1983.

TIMPL, R., ROHDE, H., ROBEY, P. G., RENNARD, S. I., FOIDART, J. M., MARTIN, G. R. Laminina glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem*, 254, n°19, p.9933-9937, 1979.

TOCCI, A., FORTE, L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *The Hematology Journal: The Official Journal of The European Haematology Association/EHA [S.I.]*, v.4, n°2, p.92-96, 2003.

TOMA, C., PITTENGER, M. F., CAHILL, K. S., BYRNE, B. J., KESSLER, P. D. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 105, p.93-98, 2002.

TSE, W., LAUGHLIN, M. J. Umbilical Cord Blood Transplantation: A New Alternative Option. *Hematology [S.I.]*, v.2005, n°1, p.377-383, 2005.

TUCKETT, F. & MORRISS-KAY, G. M. The distribution of fibronectin, laminin and entactin in the neurulating rat embryo studied by indirect immunofluorescence. *J Embryol Exp Morph*, v.94, p.95-112, 1986.

VAN DER FLIER, A. & SONNENBERG, A. Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta*, v.1538, p.99-117, 2001.

VERFAILLIE, C. M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends in Cell Biology*, v.12, n°11, p.502-508, 2002.

WALKER, J. Weight of the human fetus and of its placenta. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 19, p.39, 1954.

WANG, H.S., HUNG, S.C., PENG, S.T., et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, v.22, p.1330-7, 2004.

WILLIAMS, R. L., HILTON, D. J., PEASE, S., WILSON, T. A., STEWART, C. L., GEARING, D. P., WAGNER, E. F., METCALF, D., NICOLA, N. A. & GOUGH, N. M. 'Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells.' *Nature*, 33, nº6200, p.684-687, 1988.

WAKITANI, S., SAITO, T., CAPLAN, A. I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, 18, p.1417-1426, 1995.

WITKOWSKA-ZIMNY, M. & WROBEL, E. Perinatal sources of mesenchymal stem cells: Wharton's jelly, amnion and chorion. *Cell Mol Biol Lett*, 16, p.493-514, 2011.

WOODLING, B. A. KROENER, J. M., PUFFER, H. W., FURUKAWA, S. B., ANDERSON, JR., G., OCHOA, R. G. & WARNER, N. E. - Examen macroscópico de la placenta. *Clin Obst Ginecol*, 1976.

WU, C. C., CHAO, Y. C., CHEN, C. N., CHIEN, S., CHEN, Y. C., CHIEN, C. C., CHIU, J. J., YEN, B. L. Synergism of biochemical and mechanical stimuli in the differentiation of human placenta-derived multipotent cells into endothelial cells. *Journal of Biomechanics [S.I.]*, v.41, p.813-821, 2008.

YAMADA, K. M. Fibronectin and other cell interactive glycoproteins. In: HAY, E.D., (Ed.). *Cell biology of extracellular matrix*. 2. ed. New York. Plenum Press, p.111-146, 1991.

YEN, B. L., CHIEN, C. C., CHEN, Y. C., CHEN, J. T., HUANG, J. S., LEE, F. K. and HUANG, H. Placenta-Derived Multipotent Cells Differentiate into Neuronal and Glial Cells In Vitro. *Tissue Engineering Part A [S.I.]*, v.14, nº1, p.9-17, 2008.

YEN, B. L., HUANG, H. I., CHIEN, C. C., JUI, H. Y., KO, B.S., YAO, M., SHUN, C. T., YEN, M. L., LEE, M. C., CHEN, Y. C. Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells*, 23, p.3-9, 2005.

YURCHENCO, P. D., BIRK, D. E. & MECHAM, R. P. *Extracellular Matrix. Assembly and Structure*. California. Academic Press, 1994.

VOROTNIKOV, A.V. "Chemotaxis: movement, direction, control", Biochemistry (Biokhimiia), v. 76, p.1528-1555, 2011.

ZHANG, C. & SUN, A. & ZHANG, S. & YAO, K. & WU, C. & FU, M. et al. "Efficacy and safety of intracoronary autologous bone marrow-derived cell transplantation in patients with acute myocardial infarction: insights from randomized controlled trials with 12 or more months follow-up". Clinical Cardiology, v. 33, p.353-360, 2010.

ZONGNING, M., JIM, J., CHEN, L., ZHU, J., HUANG, W., ZHÃO, J., QIAN, H. and ZHANG, X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. Cell Biology International [S.I.], v.30, p.681-687, 2006.

ZUK, P. A., ZHU, M., MIZUNO, H., HUANG, J., FUTRELL, J. W., KATZ, A. J., BENHAIM, P., LORENZ, H. P. and HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng, v.7, p.211-228, 2001.